Ueber den Einfluß der chemischen Konservierungsmittel auf die Verdauungsfermente und die chemische Umwandlung der p-Oxybenzoesäure und ihrer Ester im menschlichen Organismus

---

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
genehmigt von der Philosophischen Fakultät
der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin.

Von

Ruth Neufeld
aus Berlin.

Tag der mündlichen Prüfung: 6. 7. 1933.
Tag der Promotion: 13. 12. 1933.

Spezialdruckerei für Dissertationen Dr. Hermann Eschenhagen, KG., Ohlau i. Schl.

84

Referenten:

Professor Dr. S a b a l i t s c h k a.

Professor Dr. M a n n i c h.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Für die Entscheidung der Möglichkeit und Zulässigkeit, die menschlichen und tierischen Nahrungsmittel mit Hilfe chemischer Substanzen gegen vorzeitige Zersetzung durch Mikroben zu schützen, ist die Kenntnis der Einwirkung solcher Substanzen auf den menschlichen und tierischen Organismus notwendig. Stoffe, bei denen in den für die Konservierung von Lebensmitteln in Betracht kommenden Konzentrationen eine Giftwirkung von vornherein naheliegt, müssen deshalb als Konservierungsmittel für Lebensmittel selbstverständlich ausscheiden. Aber auch solche Substanzen, die im allgemeinen nicht für Giftstoffe gehalten werden, müssen daraufhin geprüft werden, wie sie bei dauernder Zufuhr im menschlichen Körper wirken. Da solche Substanzen in den kleinen Mengen, in welchen sie als Konservierungsmittel benutzt werden, den Körper kaum so sichtbar schädigen, daß der Mediziner diese Schädigung ohne weiteres erkennen kann, muß man auf chemischem Wege der Einwirkung der Substanzen auf den Körper nachgehen. So ist einmal zu prüfen, welchen Einfluß die Substanzen auf jene Fermente ausüben, welche die Verdauung durchführen. Andererseits sind die chemischen Umwandlungen der Substanzen im Körper und die Art, in welcher sie wieder ausgeschieden werden, zu ermitteln.

Ueber den Einfluß der bisherigen Konservierungsmittel auf Verdauungsfermente liegen vereinzelte Untersuchungen vor. Die chemische Umwandlung von bisher viel benutzten Konservierungsmitteln wie Benzoesäure und Salicylsäure im Organismus ist bereits wiederholt untersucht worden. Noch nicht so weitgehend ist die chemische Umwandlung der neuerdings als Konservierungsmittel für Lebensmittel in Anwendung gekommenen Ester der p-Oxybenzoesäure untersucht. Da diese Ester in dem neuen Entwurf einer „Verordnung über Konservierungsmittel“[1]) für eine große Zahl von Lebensmitteln als Konservierungsmittel zugelassen sind, erschien eine Feststellung der chemischen Umwandlungen dieser Ester wie auch der

p-Oxybenzoesäure selbst im menschlichen Organismus erwünscht.

Auf Veranlassung von Herrn Professor S a b a l i t s c h k a wurde daher:

A) der Einfluß der als Konservierungsmittel für Lebensmittel benutzten chemischen Substanzen auf Verdauungsfermente untersucht,

B) die chemische Umwandlung der p-Oxybenzoesäure und des Propyl- und Benzylesters derselben im menschlichen Körper verfolgt.

A.

Ueber Wirkung von Giften auf den Stärkeabbau durch Speichelamylase, speziell der menschlichen, d. h. über eine Behinderung ihrer Fermenttätigkeit sind von verschiedenen Autoren Versuchsergebnisse veröffentlicht worden. Die vorliegenden Arbeiten sind in neuere und ältere einzuteilen. Bei den älteren Veröffentlichungen ist meist als Untersuchungsmode die qualitative Wohlgemuthsche angewandt, die auf dem Jodnachweis noch unverdauter Stärke beruht. Die Forscher in neuerer Zeit bedienen sich der recht genauen quantitativen Willstätterschen oder Bertrandschen Methode.

Es sind bisher mit folgenden Giften Versuche ausgeführt: Sublimat, Arsen- und Antimonverbindungen, Kupfersulfat, Kobalt-, Nickel-, Mangan- und Kadmiumsulfat, Bleiacetat, mit Jod, Anilin, Silbernitrat und Formaldehyd.

Da sich meine Versuche auf die Einwirkung ganz anderer Stoffe auf Speichelamylase erstreckten, lassen sie sich mit den bisherigen Beobachtungen kaum vergleichen. Direkt vergleichbar mit den Angaben anderer Autoren sind die hier mit Sublimat angestellten Versuche. Diese Versuche waren zur Nachprüfung der widersprechenden Angaben von Hata[2]) und Persson[3]) notwendig. Nach letzteren soll Sublimat in abnehmenden Konzentrationen bald eine Hemmung, bald eine Beschleunigung der Stärkespaltung durch die Speichelamylase verursachen. Hata konnte eine solche Stimulation durch Sublimat in bestimmten niederen Konzentrationen aber nicht feststellen. Würden die Angaben Perssons aber zutreffen, so wäre derselbe Wechsel von fördernder und hemmender Wirkung bei fallender Konzentration der hier geprüften Giftstoffe möglich, was die Versuche stören könnte. Es sei vorausgeschickt, daß Perssons Beobachtungen nicht bestätigt werden konnten.

Hata untersuchte nach der Wohlgemuthschen Methode „die Sublimathemmung der Fermentwirkung" und fand, aus-

gehend von der Höchstkonzentration 0,00042% Sublimat, bei 0,00042% bis 0,00014% allein eine absolute Hemmung der Amylasewirksamkeit. Von 0,00014% an fand er fast mit allen Fermentkonzentrationen seiner Reihe eine ungehemmte Verdauung. Er sagt zu seinen Versuchen „es sei gleich betont, daß es nicht gelang, eine Steigerung der Fermentwirkung durch Sublimat ausfindig zu machen."

Anders ist das Resultat bei den von Persson ebenfalls mit der Wohlgemuthschen Methode ausgeführten Versuchen. Er fand bei einer Sublimatkonzentration von 10^{-6}, 10^{-20}, 10^{-35}, 10^{-55} eine Verdauungshemmung, während er bei 10^{-15}, 10^{-25}, 10^{-45}, 10^{-60}, 10^{-65} eine Verdauungsbeschleunigung festzustellen vermeint. (Verdünnungen hergestellt nach der Dezimalskala).

Ich fand im Gegensatz zu Persson, im Einklang mit Hata, unter Fortsetzung der Hataschen Untersuchungen mit der gleichen Versuchsmethode wie Persson und der Bertrandschen Methode bei Anwendung der oben angegebenen Konzentrationen eine zwar ungehemmte, aber auch ungeförderte Verdauung.

Smorodinzew[4]) untersuchte mit der Wohlgemuthschen Methode die Wirkungen von Arsen- und Antimonverbindungen mit Speichelamylase und fand, daß Antimontrichlorid, Brechweinstein und Kalium- wie Natriumarsenit auch in den kleinen Konzentrationen die Tätigkeit der Amylase hemmen.

Sherman[5]) untersuchte neben anderen Amylasen mit der Shermanschen Methode auch Speichelamylase auf ihre Beeinflußbarkeit durch Chloroform, Toluol, Kupfersulfat und Formaldehyd. Toluol hatte wenig Einfluß auf die amylolytische Verdauung. Formaldehyd in den Konzentrationen 0,000174 molar bis 0,000058 molar hemmte, wobei der schädigende Einfluß mit der Konzentration zunahm. Chloroform griff die Amylase wenig an. Als besonders giftig erwies sich Kupfersulfat. Es zeigte in 0,000084 molarer bis 0,000028 molarer Lösung einen stark hemmenden Einfluß auf die Amylasetätigkeit.

Chittenden[6]) untersuchte den Einfluß von 1%- und 5%igem Antipyrin auf Amylase und fand kaum eine Hemmung. Ebenfalls nicht wesentlich hemmte 2%iges Antefibrin. 3%iges Aethylurethan verzögerte die Verdauung etwas. Paraldehyd in den Konzentrationen 0,5%, 1% und 2% hemmte sie

stark. 0,1% Thalliumsulfat verzögerte die Verzuckerung durch Amylase etwas, 0,3% derselben Salzlösung hob sie ganz auf.

Von den neueren Arbeiten ziehe ich die von Olsson und von Myrbäck heran. Olsson[7]) untersuchte die Giftwirkung von Anilin, Formaldehyd und Kupfersulfat mit der Bertrandschen Methode und fand, daß Anilin in der höchsten untersuchten Konzentration 0,0258 n die Speichelamylasetätigkeit deutlich hemmte. Formaldehyd wirkte durchweg hemmend, und zwar nahm der Grad der Hemmung von der Konzentration 0,018 n bis 0,112 n zu. Kupfersulfat, das in Lösungen vom Normalitätsgehalt $1{,}5.10^{-5}$ bis 6.10^{-5} n untersucht wurde, hemmte stark. Bei dem Versuch mit $2{,}5.10^{-5}$ n Kupfersulfat war die diastatische Kraft schon auf die Hälfte gesunken.

Myrbäck[8]) untersuchte Kupfersulfat, Sublimat, Bleiacetat, Kobalt-, Nickel-, Mangan- und Kadmiumsulfat in ihren Wirkungen auf die Speichelamylase mit der Willstätterschen Titrationsmethode. Er stellte fest, daß Kupfer und Quecksilber am stärksten die Tätigkeit der Amylase hemmen, dann folgen Nickel und Cadmium. Myrbäck untersuchte Kupfersulfatlösungen in den Konzentrationen 2.10^{-6} n bis 10^{-4} n bei verschiedenem pH. Sie hemmten alle die amylolytische Verdauung. Außerdem untersuchte er Sublimatlösungen vom Normalitätsgehalt 4.10^{-5} n bis 10^{-4} n bei verschiedenem pH. Diese hemmten in höheren Konzentrationen stark, jedoch nahm die hemmende Wirkung mit der Konzentration ab. Dieselben Versuche, mit salzfreier Amylase ausgeführt, ergaben, daß dieselbe ohne Salzgehalt durch die Gifte noch erheblich stärker gehemmt wird.

Von Interesse für meine folgenden Untersuchungen sind die Angaben von Myrbäck[8]) über die pH Kurve der Amylasewirksamkeit. Für ein pH 4,5 fand er R-8, für ein pH 5,2 R-37, für ein pH 6,1 R-98, für ein pH 6,75 R-100.

In gleicher Weise untersuchte Ernström[3]) mit der Bertrandschen Methode die Abhängigkeit der Ptyalinwirkung von der Acidität. Das Optium der Amylasewirksamkeit fand er bei pH 6,8 wie Myrbäck. Er setzt v hierfür gleich 100. Bei pH 5 war v dann nur noch 47.

Ich untersuchte mit der Bertrandschen Methode die nachgenannten Stoffe in 5 Konzentrationen auf ihre Wirkung auf die Speichelamylase. Es hemmten Salicylsäure, p-Oxybenzoesäure, und Benzoesäure in den angewandten Konzentrationen

0,2%, 0,16%, 0,12%, 0,08% und 0,04% die Stärkespaltung durch Speichelamylase völlig, Ameisensäure in den Konzentrationen 0,4%, 0,32%, 0,24%, 0,16%, 0,08%, ebenso schweflige Säure in den Konzentrationen 0,125%, 0,100%, 0,075%, 0,050%, 0,025%. Borsäure in den Konzentrationen 1,5%, 1,2%, 0,9%, 0,6%, 0,3% beeinflußte die Verdauungskraft der Amylase garnicht. Ebenso hatte p-Chlorbenzoesäure in den Konzentrationen 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,002% und 0,001% keine Wirkung auf die Speichelamylase; höhere Konzentrationen waren wegen der geringen Löslichkeit dieser Säure in wässerigem Medium hier nicht prüfbar.

Hexamethylentetramin in den untersuchten Konzentrationen 0,3%, 0,24%, 0,18%, 0,12% und 0,06% hemmte die amylolytische Kraft des Fermentes nicht. Der Methylester der p-Oxybenzoesäure war in den Konzentrationen 0,2%, 0,16%, 0,12%, 0,08% 0,04% ohne Wirkung auf die Amylase. Ebenso der Aethylester der Säure in den Konzentrationen 0,1%, 0,08%, 0,06%, 0,04%, 0,02% und der Propylester der Säure in den Konzentrationen 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02% und 0,01%.

Ich untersuchte dann die Natriumverbindungen der Salicylsäure, p-Oxybenzoesäure und Benzoesäure, entsprechend den Säurekonzentrationen 0,2% bis 0,04% und fand, daß sie die Amylase in den untersuchten Konzentrationen nicht schädigen. Ebenso untersuchte ich auch Natriumformiat und Natriumsulfit in den Säuren entsprechenden Konzentrationen. Beide hemmten die Wirksamkeit der Amylase nicht.

Bei den Estern der p-Oxybenzoesäure und bei Borsäure und den niederen Konzentrationen der p-Chlorbenzoesäure konnte ich keine Behinderung der Amylase beobachten. Die übrigen Säuren hemmten jedoch in allen obigen Konzentrationen die amylolytische Verdauung. Zieht man die dabei gemessenen pH-Werte in Betracht, so kann man die starke Giftwirkung der pH-Verschiebung ins saure Gebiet zuschreiben. Dies stimmt mit den angegebenen Untersuchungen von Myrbäck[8]) und auch Ernström[9]) gut überein. Waren die Versuchslösungen jedoch hinreichend gepuffert, oder ging ich von den Natriumsalzen aus, sodaß die Säuren als Natriumsalze in dem Amylolysegemisch vorlagen, so konnte in den untersuchten Konzentrationen keine Hemmung beobachtet werden.

Für die Giftwirkung chemischer Verbindungen gegen Pankreasamylase wären in erster Linie die beiden mit modernen Methoden ausgeführten Arbeiten von Myrbäck und Sherman zu berücksichtigen.

Myrbäck[8]) untersuchte auch bei der Pankreasamylase mit der Willstätterschen Titrationsmethode den Einfluß des Sublimats bei wechselndem pH. Die Ergebnisse seiner Untersuchungen über Pankreasamylase stimmen im wesentlichen mit seinen Resultaten von der Speichelamylase überein. (S. S. 7.)

Sherman[5]) untersuchte den Gang der amylolytischen Verdauung mit Pankreatin und gereinigter Pankreasamylase bei Gegenwart von Chloroform, Toluol, Kupfersulfat und Formaldehyd mit der Shermanschen Methode. Niederige Konzentrationen von Chloroform beeinflußten Pankreatin in seiner Wirksamkeit nicht, wohl aber gereinigte Pankreasamylase. Toluol hatte sowohl auf gereinigte wie auf ungereinigte Amylase wenig Einfluß. Formaldehyd hinderte die Wirksamkeit des Pankreatins noch stärker als die der gereinigten Pankreasamylase, nämlich schon in 0,000011 molarer Lösung. Sehr empfindlich zeigte sich Pankreasamylase auch gegen Kupfersulfat. Eine 0,00054 molare Lösung des Kupfersulfats veranlaßte schon eine fast vollständige Zerstörung des Fermentes.

Bei meinen Versuchen wurden die oben bei Speichelamylase angewandten Stoffe in denselben Konzentrationen verwendet und nach der Bertrandschen Methode auf ihren Einfluß auf Pankreasamylase untersucht. Salicyl- und p-Oxybenzoesäure in den Konzentrationen 0,2%—0,04% hemmten die Wirksamkeit der Amylase völlig. Benzoesäure von 0,2%—0,04% hatte die gleiche Wirkung. Borsäure in den Konzentrationen 1,5%—0,3% schädigte die Verdauungskraft der Pankreasamylase nicht. p-Chlorbenzoesäure von 0,006% bis 0,001% hatte keine Wirkung. Hexamethylentetramin in den Konzentrationen 0,3% bis 0,06% schädigte die Pankreasamylase ebenfalls nicht. Der Methylester der p-Oxybenzoesäure in den Konzentrationen 0,2%—0,04% hatte keinen Einfluß auf die amylolytische Verdauung, ebenso wie der Aethylester derselben Säure in den Konzentrationen 0,1% bis 0,02% der Propylester der Säure in den Konzentrationen 0,05% bis 0,01% die amylolytische Verdauung nicht beeinflußten. Die Ameisensäure in den Konzentrationen 0,4% bis 0,08% und die schwef-

lige Säure in den Konzentrationen 0,125% bis 0,025% hemmten die amylolytische Verdauung ganz. Natriumbenzoat, entsprechend 0,2% bis 0,04% Benzoesäure, schädigte die Wirksamkeit der Amylase nicht, ebenso waren auch p-Oxybenzoesaures-Natrium und Salicylsaures-Natrium, in 0,2% bis 0,04% Säure entsprechenden Konzentrationen, ohne Wirkung auf die Pankreasamylase. Natriumsulfit, in Konzentrationen entsprechend 0,125% bis 0,025% schwefliger Säure, hemmte die Amylasetätigkeit nicht, ebenso hatte Natriumformiat, in 0,4% bis 0,08% Ameisensäure entsprechenden Konzentrationen, keinen Einfluß.

Die Resultate sind ähnlich wie bei Speichelamylase. Die Säuren wirken stark hemmend auf die Verdauungstätigkeit der Pankreasamylase. Nach der Messung der pH-Werte kann die Hemmung auf die Verschiebung des pH unter den Neutralpunkt zurückgeführt werden. Die hinreichend gepufferten Lösungen, d. h. die Lösungen in denen die Säuren als Natriumsalze vorlagen und die übrigen untersuchten Stoffe zeigten keine Amylase behindernde Wirkung.

Ueber die Pepsinverdauung ist von den in dieser Arbeit untersuchten Fermentwirkungen am meisten gearbeitet worden. Methoden zur Messung der Pepsinwirksamkeit, allerdings hauptsächlich qualitativer Art, existieren zahlreich, und es wurden viele chemische Stoffe in der Wirkung gegenüber dem Ferment geprüft. Es liegen sowohl ältere als auch ganz neue Arbeiten vor. Wenn deren Autoren auch vielfach von ganz anderen Gesichtspunkten ausgingen wie ich, so finden sich doch Resultate in den einzelnen Arbeiten, die sich zum Vergleich heranziehen und verwerten lassen.

Von Pinkussohn [10]) liegen mit der Fuldschen Methode ausgeführte Untersuchungen über die Wirkung der Metallkolloide auf Pepsin vor. Er stellte dabei für die Kolloide des Silbers, Goldes, Zinns, Wismuts, Quecksilbers, Arsens und Selens eine mit der Konzentration wachsende Hemmung fest.

Vandevelde und Poppe [11]) konnten in der Pepsinwirksamkeit keinen Unterschied bei Zusatz von Natriumfluorid feststellen.

Langley [12]) fand mit der Grütznerschen Methode eine vollständige Aufhebung der Pepsinwirksamkeit durch Soda.

Hata [2]) untersuchte auch bei Pepsin mit der Jacobyschen Ricinmethode die Wirkungen des Sublimats und fand, daß nur

die 0,22 bis 0,11%igen Sublimatlösungen die Wirksamkeit des Pepsins stark herabsetzten.

Die folgenden Arbeiten behandeln Versuche mit Stoffen, die ich auch untersuchte.

Levites[13]) untersuchte den Einfluß von Salzen, in den Konzentrationen 1/16 n bis 1 n, auf die peptidische Verdauung. Er kam zu dem Ergebnis, daß sämtliche Salze mit steigender Konzentration auch stärker bei der Pepsinverdauung hemmen.

Krüger[14]) untersuchte ebenfalls die Wirkung von Chloriden auf die peptidische Verdauung. Er fand, daß Chloride dieselbe hemmen, und zwar äquivalente Mengen in gleichem Maße.

Der Einfluß des Alkohols auf Pepsinwirksamkeit wurde wiederholt untersucht. Ich führe an dieser Stelle nur zwei Arbeiten an, an anderer Stelle sind dann weitere Versuchsergebnisse über die Wirkung des Alkohols angegeben.

Pawlowsky[15]) fand, daß Alkohol schon in Konzentrationen von 0,5 bis 0,75% hemmt.

Dagegen kam Haneborg[16]) in seiner umfangreichen Arbeit durch seine Versuche zu dem Resultat, daß Alkohol unter 10% auf die Pepsinverdauung kaum eine Wirkung hat, während er in 15%igen Lösungen schon eine Verminderung der Verdauungskraft auf die Hälfte, in 20%iger Lösung und in höheren Konzentrationen eine völlige Hemmung der Verdauung hervorruft.

Alfonsky[17]) fand mit der Mettschen Methode, daß die Borsäure die Pepsinverdauung hemmt.

Ebenfalls die Borsäurewirkung und außerdem den Einfluß von Kochsalz, Paraldehyd, Urethan, Antefibrin, Thein und Kaffein prüfte Chittenden[6]). Bei den untersuchten Borsäuremengen von 0,1% bis 3% fand er absolut keine Hemmung der Pepsinwirksamkeit, Kochsalz hemmte ab 0,5%, Paraldehyd 2%ig, Urethan 1- und 5%ig, Antefibrin 0,2%ig und 0,5%ig hemmten ziemlich wenig, ebenso 1%iges Thein und 4%iges Kaffein.

König[18]) verglich den Einfluß von Benzoesäure und Hacksalz (Natriumbenzoat) mit dem der Citronensäure auf die peptidische Verdauung und kam zu dem Ergebnis, daß Benzoesäure und Hacksalz die Pepsinverdauung in den unter-

suchten Konzentrationen von 0,5 bis 0,05% hemmten, während die gleiche Menge Zitronensäure gar keinen Einfluß hatte.

Nach der Edestinmethode und zum Vergleich mit der Mettschen Methode untersuchten Heiduschka und Förster[19]) den Einfluß von Antipyreticis, Antisepticis und Hypnoticis auf die Pepsinverdauung. Sie fanden nur einige wenige indifferente Stoffe, im allgemeinen aber Hemmung durch die untersuchten Stoffe. Die von ihnen untersuchte Salicylsäure hemmte in den Konzentrationen 0,75% bis 0,05% durchweg, jedoch bei 0,05% ziemlich wenig. Hexamethylentetramin in den Konzentrationen 0,1% bis 5% hemmte nach ihren Versuchen nur in geringem Maße, allerdings nur soweit kein Formaldehyd abgespalten wird, was in saurer Lösung aber doch bald geschieht.

Schütz[20]) fand mit der Polarisationsmethode bei Gegenwart von 2% Alkohol die Pepsinverdauung behindert; 15%iger Alkohol brachte sie zum Stillstand. 0,006% Salicylsäure behinderte ebenfalls die Verdauung, durch 0,01% Salicylsäure wurde sie vollständig gehemmt.

Heineberg und Bachmann[21]) prüften neben anderen Stoffen Benzoesäure, Salicylsäure, Phenol und Natriumsulfit mit der Methode der Pepsinbestimmung des amerikanischen Arzneibuches und der Kjeldahlbestimmung auf ihren Einfluß auf die Pepsinverdauung. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß Salicylsäure, Natriumsulfit und Benzoesäure die Verdauung am stärksten hemmen. Geringen Einfluß zeigte Borsäure.

Sailer und Farr[22]) untersuchten mit der Mettschen Methode neben anderen Stoffen Borsäure und Borax, Alkohol Formaldehyd, Salicylsäure, Natriumbenzoat und Natriumsulfit. Borsäure und Borax zeigten selbst in gesättigter Lösung keine Wirkung auf die Verdauung durch das Ferment. Alkohol hemmte von einer 8%igen Lösung an, Formaldehyd von 4% bis 0,5% durchweg. Bei Benzoesäure konnten sie nur bis 0,13% einen hemmenden Einfluß beobachten. Zu gleichem Ergebnis kamen sie mit Natriumbenzoat. Die in den Konzentrationen 0,5% bis 0,06% untersuchte Salicylsäure hemmte in den höheren Konzentrationen die Pepsinverdauung stark. Die Giftwirkung nahm mit niederer Konzentration der Salicylsäure ab. Zu dem gleichen Resultat kamen die Verfasser mit Natriumsalicylat. Bei der Untersuchung des Natriumsulfits in Konzen-

trationen von 0,5% bis 0,062% fanden sie bei 0,5% eine starke Hemmung, die bis zu 0,062% abnahm.

Gudeman[23]) untersuchte vergleichsweise Salicylsäure, Benzoesäure, Borsäure, Alkohol, schweflige Säure, Kochsalz und Farbstoffe in den Konzentrationen 0,1% bis 2,5% auf ihren Einfluß bei der Pepsinverdauung. Dabei ergab sich bei Gudeman, daß unter 0,25% nur noch die Salicylsäure hemmte, sonst wirkte am giftigsten die Benzoesäure. Jedoch fand er, daß 0,1% Salicylsäure und ebenso 0,2% Benzoesäure nicht mehr hemmten. Bei Untersuchungen mit den Salzen der angeführten Säuren kam er in saurer Lösung zu gleichen Resultaten.

Ich untersuchte nach der Methode des Deutschen Arzneibuches die schon bei Speichelamylase und Pankreasamylase angewandten Stoffe, zum Teil in den gleichen Konzentrationen, zum Teil in erst im praktischen Teil ausführlich angegebenen, in ihrer Wirkung auf Pepsin. Die mehrfach wiederholten Versuche ergaben folgende Resultate.

Borsäure in den Konzentrationen 1,5%—0,05% hemmte die Pepsinverdauung nicht. Das Ergebnis stimmt überein mit den Angaben von Chittenden[6]), von Heineberg und Bachmann, von Sailer und Farr und von Gudeman.

Ameisensäure hemmte in den Konzentrationen 0,4% bis 0,2%; 0,1% der Säure hemmte nicht mehr.

Schweflige Säure wurde in den Konzentrationen 0,125% bis 0,063% als hindernd für die Pepsinwirksamkeit erkannt. 0,031% der Säure hemmte nicht mehr. Zu dem gleichen Ergebnis kamen mit der schwefligen Säure Gudeman, mit Natriumsulfit Heineberg und Bachmann sowie Sailer und Farr.

Salicylsäure hemmte die Verdauung durch Pepsin in Konzentrationen von 0,2% bis 0,04% durchweg; jedoch nahm die Stärke der Hemmung mit der Konzentration ab. Gleiche Resultate erhielten Heiduschka und Förster, Schütz, Heineberg und Bachmann, Sailer und Farr und Gudeman.

Benzoesäure hinderte die Pepsinwirksamkeit ebenfalls in den untersuchten Konzentrationen 0,2% bis 0,05%. Die Stärke der Hemmung nahm mit niedriger werdender Konzentration ab. Das Resultat läßt sich vergleichen mit den Ergebnissen von König, Heineberg und Bachmann, Sailer und

Farr bis zur Konzentration von 0,13%. Gudeman dagegen konnte bei 0,2% Benzoesäure schon keine Hemmung mehr feststellen.

Hexamethylentetramin hemmte die peptidische Verdauung in den Konzentrationen 0,3% bis 0,025%. 0,01% des Stoffes hemmte nicht mehr. Diese Beobachtungen sind wohl auf die Abspaltung von Formaldehyd zurückzuführen und decken sich mit den Angaben von Heiduschka und Förster.

p-Oxybenzoesäure hemmte in der Konzentration 0,2% etwas, die niedrigeren Konzentrationen beinflußten die peptidische Verdauung nicht.

Der Methylester der p-Oxybenzoesäure verzögerte die Pepsinverdauung von 0,2% bis 0,1%, 0,05% des Esters hemmten nicht mehr.

Der Aethylester der p-Oxybenzoesäure hemmte die Pepsinwirksamkeit von 0,1% bis 0,05%; in der Konzentration 0,02% verzögerte er die Verdauung nicht mehr.

Der Propylester der p-Oxybenzoesäure hinderte die Pepsinverdauung in den Konzentrationen 0,05 bis 0,0375%, 0,025% hinderte nicht mehr.

p-Chlorbenzoesäure beeinflußte die Pepsinverdauung in den untersuchten niederen Konzentrationen 0,0060% bis 0,0006% nicht.

Alkohol hemmte die Pepsinwirksamkeit in den Konzentrationen 10% bis 8%, von 8% an war er ohne Einfluß. Das Resultat stimmt mit den Angaben von Haneborg und Sailer und Farr überein.

Kochsalz behindert die Pepsinverdauung in den Konzentrationen von 6% bis 0,6% ziemlich. Von 0,4% bis 0,1% war es ohne Wirkung. Das Resultat stimmt überein mit den Angaben von Krüger und auch von Levites und von Chittenden.

Arbeiten über den Einfluß der von mir geprüften Stoffe auf die tryptische Verdauung liegen nicht vor. Die bisher veröffentlichten Versuche mit Trypsin sind auch nicht nach den neuen Methoden der Fermentuntersuchungen ausgeführt. Jedoch will ich kurz auf die bisher beobachteten Giftwirkungen chemischer Stoffe gegen Trypsin eingehen:

Folgende Stoffe wurden bisher auf ihren Einfluß auf die tryptische Verdauung untersucht: Metallkolloide, Formaldehyd, Chloroformwasser, Toluol, Thymolwasser, Antipyrin,

Antefibrin, Paraldehyd, Sublimat, Natriumfluorid, Alkalisalze der Halogene, Natriumoxalat, Natriumsulfat und Borax.

Die Untersuchungen über Metallkolloide sind von Pinkussohn[10]) mit der Fuldschen Methode ausgeführt. Er untersuchte die Kolloide des Silbers, Goldes, Arsens und Wismuts und fand, daß sie bei Pepsin stärker mit ansteigender Konzentration hemmen.

Ebenfalls mit der Fuldschen Methode untersuchte Hata[3]) Sublimatlösungen und fand, daß diese in Konzentrationen unter 0,05% nicht mehr hemmen.

Vandevelde und Poppe[11]) untersuchten den Einfluß von 0,12% Natriumfluorid auf Trypsin. Sie stellten keinen Unterschied in der Verdauungskraft fluorfreier und fluorhaltiger Verdauungsgemische fest.

Chittenden[8]) fand die Trypsinwirksamkeit durch 0,2% bis 2% Paraldehyd stark vermindert, durch 0,2% bis 1% Antifibrin stark gehemmt.

Loew[24]) fand, daß bei Einwirkung von Formaldehyd Trypsin wie die übrigen Fermente seine Wirksamkeit verliert.

Weiß[25]) prüfte die Giftwirkungen der Alkalisalze der Halogene, des Natrium-Oxalats und Sulfats und des Borax. Er fand, daß die Alkalisalze der Halogene die Verdauung nur wenig stören, am meisten noch das Kochsalz und zwar ab 0,5 steigend bis 5%. Ebenfalls hemmt Natrium-Oxalat und Sulfat, Borax ist ohne Einfluß.

Kaufmann[26]) untersuchte nach Grützner und nach Mett die Einwirkungen von Natriumfluorid, Chloroform, Toluol und Thymolwasser auf die tryptische Verdauung. Er stellte fest, daß durch eine 2%ige Natriumfluoridlösung eine Hemmung der tryptischen Verdauung auftritt, ebenso durch Einwirkung von Chloroform. Ganz ähnlich in der Wirkung zeigten sich Toluol 5%ig und Thymolwasser.

Ich untersuchte auch bei Trypsin dieselben Stoffe in gleichen Konzentrationen, wie bei Speichelamylase. Wegen des alkalischen Gebiets, in dem das Trypsin im Körper bei der Verdauung einwirkt, wurde von der Untersuchung der freien Säuren hier z. T. abgesehen und gleich die Natriumverbindungen, wie unten ersichtlich, untersucht.

Während die bisher über die Giftwirkung auf Trypsin ausgeführten Untersuchungen nur qualitativ waren, verfolgte

ich den Einfluß der von mir angewendeten Stoffe auf den Eiweißabbau durch Trypsin quantitativ; ich bediente mich dabei der Sörensenschen Methode. Mit dieser Methode kam ich zu folgendem Ergebnis:

Der Methylester der p-Oxybenzoesäure in den Konzentrationen 0,2 bis 0,04% hemmte die tryptische Verdauung nicht. Der Aethylester der Säure in den Konzentrationen 0,1 bis 0,02% und der Propylester der Säure in den Konzentrationen 0,05 bis 0,01% war ebenfalls ohne Einfluß auf die Trypsinwirksamkeit. Hexamethylentetramin in den Konzentrationen 0,3 bis 0,06% hatte keine Wirkung auf Trypsin. p-Chlorbenzoesäure von 0,006% bis 0,001% änderte die Verdauungskraft des Trypsins nicht. Die Borsäure zeigte in den Konzentrationen 1,5% bis 0,3% keine Wirkung auf Trypsin. Die als Natriumverbindungen vorliegenden Säuren, Salicylsäure, p-Oxybenzoesäure und Benzoesäure in Konzentrationen entsprechend 0,2 bis 0,04% der Säuren hemmten die Trypsinwirksamkeit nicht. Die Natriumverbindung der Ameisensäure in Konzentrationen, entsprechend 0,4 bis 0,08% Säure, und die Natriumverbindung der schwefligen Säure, entsprechend 0,125 bis 0,025% Säure, beeinflußten die Verdauung durch Trypsin nicht.

Ich kam also zu dem Ergebnis, daß bei pH 7 die untersuchten Stoffe in den angegebenen Konzentrationen keinen Einfluß auf die Trypsinwirksamkeit haben. Theoretisch ist mindestens für einen Teil der Säuren eine Giftwirkung anzunehmen mit Rücksicht auf die Beobachtungen bei den anderen Fermenten. Diese kann aber nicht in Erscheinung treten, da wegen der Reaktion des tryptischen Gemisches die Säuren nicht als solche, sondern in Form von Salzen vorliegen.

Soweit also bei der Amylolyse durch Speichel- oder Pankreasamylase eine Verzögerung oder vollkommene Verhinderung derselben durch Zusatz der als Konservierungsmittel benutzten Substanzen zu beobachten war, dürfte dieser schädliche Einfluß hauptsächlich auf die Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration des Reaktionsmilieus zurückzuführen sein. Aus diesem Grunde störten die Amylolyse Benzoesäure, Salicylsäure, p-Oxybenzoesäure, Ameisensäure und schweflige Säure. Die Natriumverbindungen dieser Säuren wirkten nicht schädlich auf die Amylase. Keinerlei Verzögerung oder Hemmung der amylolytischen Stärkespaltung war bei Borsäure, dem Methyl-, Aethyl-, Propylester der p-

Oxybenzoesäure, p-Chlorbenzoesäure und Hexamethylentetramin zu beobachten.

Da das Eiweiß spaltende Ferment Trypsin seine optimale Wirkung erst im relativ stark alkalischen Medium hat, war hier die Schädigung der Wirkung durch die freien Säuren gleichfalls von vornherein zu erwarten. Deshalb wurden nur die Salze der Säuren geprüft. Weder die Salze, noch irgendeine andere der geprüften Substanzen verminderten dabei das Vermögen des Trypsins, Eiweiß zu spalten.

Wohl machte sich gegenüber Pepsin, das im sauren Medium die Eiweißspaltung durchführt, bei fast allen geprüften Substanzen in den höheren Konzentrationen ein hemmender Einfluß bemerkbar. Immerhin liegen die schädigenden Konzentrationen meist über jenen Konzentrationen, die durch den Genuß von Nahrungsmitteln, die mit diesen versetzt sind, im Mageninhalt zu erwarten sind. Es sei noch besonders darauf hingewiesen, daß auch schon das Kochsalz in ähnlichen Konzentrationen eine Verzögerung oder Verhinderung des Eiweißabbaues durch Pepsin verursachte, das doch in weit höheren Konzentrationen sowohl als Konservierungsmittel wie als Würzmittel verwendet wird. Uebrigens ist anzunehmen, daß der Körper von sich aus durch eine vermehrte Magensaftsekretion und Pepsinabscheidung auf eine geringe Schädigung der Pepsinverdauung reagiert.

B.

Die Umwandlung der als Konservierungsmittel benutzten carbozyklischen Säuren und der Ester im tierischen Organismus wurde schon wiederholt studiert.

So untersuchte Neuberg[27]) die Umwandlung der Benzoesäure durch den Stoffwechsel des Menschen. Er stellte fest, daß sie praktisch frei im Harn nicht vorkommt. Sie war an Glykokoll gebunden und ließ sich durch besonders ausgearbeitete Methoden bestimmen.

Ebenfalls nach synthetischen und Abbauprodukten der Benzoesäure suchte Rost[28]), und zwar nach Eingabe von Benzoesäure an Hunde. Er fand, daß der Benzolring der Säure im Tierkörper unzerstörbar ist und die Benzoesäure daher ungespalten und als gepaarte Verbindung mit Glykokoll ausgeschieden wird.

Quick[29]) machte seine Versuche unter Verfütterung von Abkömmlingen der Benzoesäure an Hunde. Er prüfte einige substituierte Benzoesäuren und fand, daß Substitution in o-Stellung die Paarung mit Glykokoll stark hemmt. Die Bindungsfähigkeit der Benzoesäure an Glucuronsäure wird durch eine o-Säuregruppe vermindert.

Diack und Lewis[30]) fütterten Kaninchen mit Natriumbenzoat, Benzylalkohol und Benzylestern. Bei ihren Untersuchungen fanden sie alle diese Stoffe durch Umwandlung in Benzoesäure als Hippursäure ausgeschieden.

Power und Sherwin[31]) stellten neben anderen Stoffen auch mit Benzoesäure und p-Oxybenzoesäure Versuche im Stoffwechsel an. Sie fanden nach Verfütterung an nüchterne Menschen die Benzoesäure als Hippursäure wieder. Die p-Oxybenzoesäure glauben sie unverändert wieder zu erhalten.

Speziell die Umwandlung der p-Chlorbenzoesäure untersuchte Wührer[32]) bei Hunden. Er fand im Harn als Endprodukte des Stoffwechsels nach Eingabe von p-Chlorbenzoe-

säure: p-Chlorbenzoesäure und p-Chlorhippursäure. Die gewonnenen Säuremengen schwankten in ihrem prozentualen Verhältnis bei den verschiedenen Versuchstieren.

Ueber die Umwandlung der Salicylsäure im Organismus stellte Holmes[33]) Untersuchungen an. Er fand, daß nach Eingaben von 2—5 g Salicylsäure Salicyl- und Salicylursäure mit dem Harn abgeschieden werden, und zwar im Verhältnis 2:3.

Girod[34]) untersuchte halogenierte Salicylsäuren und deren Ester auf ihre Veränderung im Stoffwechsel des Kaninchen. Soweit er dabei bromierte oder jodierte Salicylsäure eingab, konnte er weder Bromid und Jodid nachher nachweisen. Er erhielt die eingegebenen Salicylsäuren unabgebaut aus dem Harn wieder.

Ueber die neuerdings für besonders als Konservierungsmittel geeignet erkannten p-Oxybenzoesäureester liegen bisher nur von Schübel und Manger[35]) Angaben bezüglich deren Umwandlung im Organismus vor, während mit der Säure selbst Versuche von Quick und von Baumann und Herter[36]) unternommen wurden.

Schübel[35]) untersuchte neben dem Methyl- und Aethylester der p-Oxybenzoesäure auch den von mir verwandten Propylester, jedoch durch Verabfolgung an Hunde und Kaninchen. Er fand den Propylester in Form von p-Oxybenzoesäure ausgeschieden und konnte 21% der Säure wieder gewinnen. Bei Kaninchen konnte er nur 4% der Säure nach Verabfolgung des Propylesters zurückerhalten.

Baumann und Herter[36]) machten an Hunden auch Versuche mit der p-Oxybenzoesäure und gewannen aus dem Harn p-Oxybenzoesäure und die stickstoffhaltige Verbindung mit Glykokoll zurück.

Quick veröffentlichte Untersuchungsergebnisse über die Konjugation der drei Oxybenzoesäuren im Stoffwechsel Hundes und Menschen. Ein konstantes Verhältnis zwischen gepaarter und ungepaarter Säure ist aus den Ergebnissen nicht zu entnehmen.

Die relativ geringe Giftwirkung der Ester der p-Oxybenzoesäure auf den tierischen Organismus muß besonderes Interesse für ihre Umwandlungen im Stoffwechsel hervorrufen. Deshalb ging ich der Umwandlung des Propyl- und Benzylesters der p-Oyxbenzoesäure nach, und zwar direkt

beim Menschen, nachdem ich zuvor ebenfalls beim Menschen die Umwandlungen der freien p-Oxybenzoesäure verfolgt hatte.

Es wurde mehrere Tage eine bestimmte Menge p-Oxybenzoesäure eingenommen und während dieser Zeit und den nachfolgenden 2 Tagen der Harn restlos gesammelt. Er wurde auf die Umwandlungsprodukte der p-Oxybenzoesäure qualitativ und quantitativ geprüft, wozu eine besondere Trennungsmethode auszuarbeiten war. Von der zugeführten p-Oxybenzoesäure fand ich als solche 28% wieder, außerdem wurden 7,2% als p-Oxybenzursäure ausgeschieden. Diese wurde durch Ueberführung in die Anisursäure und deren Vergleich mit synthetischer Anisursäure, ferner durch direkten Vergleich mit auf synthetischem Wege hergestellter p-Oxybenzursäure als solche sicher charakterisiert.

Wenn nebenbei eine Ausscheidung der Säure durch Paarung mit Schwefelsäure stattfindet, so kann diese nicht erheblich sein. Der Quotient der ungepaarten und gepaarten Schwefelsäure zeigt während der Zufuhr von p-Oxybenzoesäure nur eine geringe Herabsetzung gegenüber dem normalen Wert. Es ist daraus zu schließen, daß ein erheblicher Teil der p-Oxybenzoesäure im Körper so weitgehend abgebaut oder zerstört wird, daß die dabei entstehenden Produkte im Harn nicht mehr auffindbar sind.

Von der Untersuchung des Kots wurde abgesehen, da Schübel und Manger[35]) schon zeigten, daß weder Ester noch Säure in ihm nachgewiesen werden konnten.

Die Versuche über die Veränderung des Propyl- und Benzyl-p-oxybenzoesäureesters wurden in analoger Weise ausgeführt und führten zu ganz ähnlichen Ergebnissen. Besonders bemerkenswert war hier die Tatsache, daß der Propylester auch nicht in kleinen Mengen im Harn wieder auffindbar war, und der Benzylester nur in geringer Menge. Ich fand im Harn nach der Einnahme von Propylester 13,7% der p-Oxybenzoesäure wieder und 3,7% p-Oxybenzoesäure als p-Oxybenzursäure.

Nach der Einnahme des Benzylesters konnte ich 6% des Esters aus dem Harn zurückerhalten. Außerdem fand ich 12,7% der p-Oxybenzoesäure wieder und 3,5% p-Oxybenzoesäure als p-Oxybenzursäure. Bei den Estern war die Herabsetzung des Quotienten der ungepaarten und gepaarten

Schwefelsäure deutlicher als bei der freien p-Oxybenzoesäure, sodaß ein Teil der Ester als Schwefelsäurepaarling aus dem Harn ausgeschieden wird. Es konnte daher auch beim Propylester 6,28% und beim Benzylester 7% p-Oxybenzoesäure aus dem mit konzentrierter Salzsäure behandelten Harn gewonnen werden, die in gepaarter, erst durch Säurehydrolyse frei werdender Form, ausgeschieden wurden. Die Versuche zeigen, daß die Ester im Körper fast restlos verseift werden, weshalb nur fast dieselben Umwandlungsprodukte wie bei p-Oxybenzoesäure zu erwarten sind, vorausgesetzt, daß der Alkoholanteil des Esters im Körper vollkommen verbrannt wird. Beim Benzylester ist dies nicht der Fall, es tritt vielmehr eine deutliche Vermehrung der Hippursäure auf. Dies ist durch die Oxydation des Benzylalkohols zu Benzoesäure und deren normaler Paarung mit Glykokoll zu erklären. Quick[29]) wies dies bereits für den Benzylester der Bernsteinsäure nach. Es ist verständlich, daß auch bei den Estern wie bei der Zufuhr der freien p-Oxybenzoesäure ein erheblicher Anteil so verändert wird, daß irgendwelche Umwandlungsprodukte im Harn nicht mehr auffindbar sind.

Versuchsteil.

A.

Bei den auf die Fermente zur Einwirkung zu bringenden Konzentrationen war man abhängig von der Löslichkeit der zu prüfenden Substanzen. Deshalb konnte man zum Teil wie bei der p-Chlorbenzoesäure nur äußerst geringe Konzentrationen benutzen.

Es wurde geprüft:

Benzoesäure in den Konzentrationen 0,2%, 0,16%, 0,12%, 0,08%, 0,04%.

Das Natriumbenzoat in den Konzentrationen 0,236%, 0,188%, 0,142%, 0,094%, 0,047% entsprechend 0,2% der Säure etc.

Salicylsäure und p-Oxybenzoesäure in 0,2%, 0,16%, 0,12%, 0,08%, 0,04%; die Natriumverbindungen beider Säuren in 0,233%, 0,186%, 0,144%, 0,093% und 0,046% wieder entsprechend 0,2% der Säuren etc.

Ferner wurden untersucht:

Der Methylester der p-Oxybenzoesäure in den Konzentrationen 0,2%, 0,16%, 0,12%, 0,08%, 0,04%, der Aethylester der Säure in 0,1%, 0,08%, 0,06%, 0,04%, 0,02%, der Propylester der Säure in 0,05%, 0,04%, 0,03% 0,02%, 0,01%.

Hexamethylentetramin in den Konzentrationen 0,3%, 0,24%, 0,18%, 0,12%, 0,06%.

Ameisensäure in den Konzentrationen 0,4%, 0,32%, 0,24%, 0,16%, 0,08%, das Natriumsalz der Ameisensäure in den der Säure entsprechenden Konzentrationen, nämlich 0,60%, 0,480%, 0,360%, 0,240%, 0,120%.

Schweflige Säure in den Konzentrationen 0,125%, 0,100%, 0,075%, 0,050%, 0,025%, das Natriumsalz der Säure in 0,192%, 0,153%, 0,115%, 0,077%, 0,038%.

Borsäure in den Konzentrationen 1,5%, 1,2%, 0,9%, 0,6%, 0,3%. p-Chlorbenzoesäure in den Konzentrationen 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,002%, 0,001%.

Diese Konzentrationen kamen bei den Untersuchungen an Speichelamylase wie auch Pankreasamylase, Trypsin und z. T. auch bei Pepsin zur Anwendung.

1. Einwirkung der Substanzen auf den Stärkeabbau durch Speicheamylase.

Außer den vorher angegebenen Substanzen wurde bei Speichelamylase auch Sublimat in den Konzentrationen 10^{-4} bis 10^{-65} zu den Versuchen herangezogen.

Als Fermentlösung verwendete ich meinen eigenen Speichel.

Der nach der Vorschrift von Pringsheim[37]) eine Stunde nach einem konstanten Frühstück von Graubrot und Kakao gesammelte Speichel wurde nach der Filtration in einer Konzentration 1 : 50 zu den Versuchen verwendet.

Die Konzentration der Versuchslösung wurde nach folgendem Schema variiert:

		1	2	3	4	5	6
1%ige Stärkelösung enthaltend Substanz	ccm	25	25	25	20	10	0
Substanzlösung	ccm	25	15	5	0	0	0
Wasser	ccm	0	10	20	25	25	25
reine Stärkelösung 1%ig	ccm	0	0	0	5	15	25

Die Stärkelösung wurde mit Sulkowskystärke hergestellt, die sich besonders für Fermentversuche eignet, weil sie durch Erhitzen mit Glyzerin und Ausfällen mit Alkohol gewonnen wird. Sie ist absolut säurefrei und hat daher keine Eigenzersetzung.

Die Versuchstemperatur wurde im Brutschrank mittels Thermostaten auf 37,5° gehalten und die Dauer der Versuche auf 30 Minuten festgesetzt. Die mit Pufferlösungen ausgeführten Versuchsreihen enthielten ein Gemisch aus primärem 1/15 molarem Kalium- und sekundärem 1/15 molarem Natriumphosphat. Die Pufferlösungen wurden nach der von Michaelis gegebenen Vorschrift hergestellt. Sie wurden einer Bürette mit automatischer Nullpunkteinstellung, die in einer Wulfschen Flasche eingeschliffen war, entnommen.

Zur quantitativen Bestimmung des aus der Stärke durch Amylolyse entstandenen Zuckers wurde die Bertrandsche Methode angewendet. Das durch Reduktionswirkung des Zuckers aus Fehlingscher Lösung abgeschiedene Kupferoxydul wird mit Ferrisulfat-Schwefelsäurelösung in Lösung gebracht und das dabei durch Kupferoxydul reduzierte Ferrisulfat mit einer Kaliumpermanganatlösung durch Titration bestimmt. Aus der so zu findenden Menge reduzierten Kupfers wird mit Hilfe einer empirisch gefundenen Tabelle die entstandene Maltose ermittelt. Ich führte die Bestimmung mit 10 ccm des Reaktionsgemisches aus.

Die fast bei allen Versuchsreihen ausgeführten pH-Messungen wurden mit der Indikatorenmethode angestellt. Es wurden Stammlösungen von m-Nitrophenol, ebenso von p, γ, α-Nitrophenol hergestellt und aus ihnen durch Verdünnen mit Sodalösung die Dauerreihen der Indikatoren. Es wurde angewendet: m-Nitrophenol für pH 8,4—6,8, p-Nitrophenol für pH 7—5,4 γ-Nitrophenol für pH 5,4—4 und α-Nitrophenol für 4,4– 2,8. Dies waren i. w. die pH-Gebiete, die zur Bestimmung kamen.

Vor den eigentlichen Versuchen wurde der Wirkungswert der Amylase geprüft. Nach Euler[38]) ist er gleich der Verzuckerungsfähigkeit gesetzt.

$$Sf = k \frac{g \text{ Maltose}}{g \text{ Präparat}} \quad \text{und} \quad k = \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{a}{a-x}$$

Minuten t	Maltose in mg M	k
10	47	0,0132
15	67	0,0130
30	127	0,0138
∞	374	—

$$k_m \ (10+15) = 0{,}0131$$

$$Sf = \frac{0{,}0131 \cdot 0{,}374}{0{,}000042} = 116{,}7.$$

Für die Sublimatuntersuchungen wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt, und zwar:

A) genau nach den Angaben von Persson[3]) und

B) als Kontrolle quantitativ nach Bertrand.

A) 5 ccm 1%ige Stärkelösung, 1% verdünnter (1:50) filtrierter Speichel, 1 ccm Sublimatlösung in Konzentration

10^{-6} bis 10^{-65} wurde 1—1½ Stunden im Thermostaten bei 38° verdaut und dann nach Wohlgemuth mit Lugolscher Lösung der Verlauf der Verdauung bestimmt. Daneben wurden Vergleichsversuche ausgeführt.

Ergebnis der mehrfach wiederholten Versuche:

Sublimatkonzentration	Ausfall der Reaktion
(+ = hellgelbe Färbung = vollkommene Amylolyse)	
10^{-6}	+
10^{-15}	+
10^{-20}	+
10^{-25}	+
10^{-30}	+
10^{-35}	+
10^{-40}	+
10^{-45}	+
10^{-50}	+
10^{-55}	+
10^{-60}	+
10^{-65}	+
$10^{-\infty}$ (Leerversuch)	+

B) 10 ccm 1%ige Sulkowskystärke wurden mit 2 ccm Sublimatlösung in den Konzentrationen 10^{-6} bis 10^{-45} und 1% verdünnten Speichel wie oben bei 38° zur Verdauung angesetzt und dann der gebildete Zucker nach Bertrand quantitativ bestimmt.

Konzentration	mg Cu	t Min.	mg Maltose
10^{-6}	34,4	40	31
10^{-15}	34,5	,,	,,
10^{-20}	34,2	,,	,,
10^{-25}	34,4	,,	,,
10^{30-}	34,4	,,	,,
10^{-35}	34,5	,,	,,
10^{-40}	34,0	,,	,,
10^{-45}	34,5	,,	,,
$10^{-\infty}$	34,5	,,	,,

Versuchszeit 30 Minuten, Versuchstemperatur 37,5°.

In 10 dem Reaktionsgemisch entnommenen ccm (Lösung auf Stärke absolut bezogen 0,6%, auf Amylase 1%, Sf der Amylase 116,8) wurde der gebildete Zucker gemessen.

Resultate der wiederholten Versuche.

Stoff	Konzentration	bei dem Versuch gemessenes pH	mg Cu	mg Maltose
Benzoesäure	0,2 %	3,1	0	0
	0,16%	3,2	0	0
	0,12%	3,3	0	0
	0,08%	3,3	0	0
	0,04%	3,5	0	0
	0%	6,1	25	23
p-Oxybenzoesäure	0,2 %	3,4	0	0
	0,16%	3,4	0	0
	0,12%	3,4	0	0
	0,08%	3,6	0	0
	0,04%	3,6	0	0
	0%	6,1	25	23
Salicylsäure	0,2 %	2,6	0	0
	0,16%	2,7	0	0
	0,12%	2,7	0	0
	0,08%	2,8	0	0
	0,04%	3,2	0	0
	0%	6,1	25,4	23
Ameisensäure	0,4 %	2,8	0	0
	0,32%	2,8	0	0
	0,24%	2,8	0	0
	0,16%	2,8	0	0
	0,08%	2,8	0	0
	0%	6,1	25,5	23
Schweflige Säure	0,125%	2,6	0	0
	0,100%	2,7	0	0
	0,075%	3,2	0	0
	0,050%	3,7	0	0
	0,025%	3,7	0	0
	0%	6,1	24	22
p-Chlorbenzoesäure	0,0058%; 0,0046%; 0,0035%; 0,0023%; 0,0012%; 0%	6,1	26	24

Stoff	Konzentration	bei dem Versuch gemessenes pH	mg Cu	mg Maltose
Borsäure	1,5%; 1,2%; 0,9%; 0,6%; 0,3%; 0%	6,1	23	21
Hexamethylentetramin	0,3%; 0,24%; 0,18%; 0,12%; 0,06%; 0%	6,1	24	22
Methylester der p-Oxybenzoesäure	0,2%; 0,16%; 0,12% 0,08%; 0,04%; 0%	6,0	23	21
Aethylester der Säure	0,1%; 0,08%; 0,06%; 0,04%; 0,02%; 0%	6,0	23	21
Propylester der Säure	0,05%; 0,04%; 0,03%; 0,02%; 0,01%; 0%	6,0	25,3	23

Die folgenden Versuche wurden unter Zugabe von Phosphatpuffer, und zwar 4,9 ccm primärem und 5,1 ccm sekundärem Phosphat ausgeführt.

Schweflige Säure	0,125%	3,8	0	0
	0,100%	3,8	0	0
	0,075%	3,8	0	0
	0,050%	4,1	0	0
	0,025%	4,3	18	16,3
	0%	6,8	25	23
Ameisensäure	0,4%	2,8	0	0
	0,32%	2,8	0	0
	0,24%	2,8	0	0
	0,16%	3,0	0	0
	0,08%	3,1	0	0
	0%	6,8	25,5	23
Propylester der p-Oxybenzoesäure	0,05%; 0,04% 0,03%; 0,02% 0,01%; 0 %	6,9	25	22,5
p-Oxybenzoesäure	0,2 %	4,4	0	0
	0,16%	4,8	13,4	12
	0,12%	5,1	22,2	21
	0,08%	5,6	24	22
	0,04%	6,4	24,5	23
	0%	6,8	25,5	23
p-Chlorbenzoesäure	0,006%; 0,005% 0,004%; 0,002% 0,001%; 0 %	6,9	25,5	23

Stoff	Konzentration	bei dem Versuch gemessenes pH	mg Cu	mg Maltose
Salicylsäure	0,2 %	3,6	0	0
	0,16%	3,5	0	0
	0,12%	3,8	0	0
	0,08%	4,2	11	10
	0,04%	6,2	26	24
	0 %	6,8	26	24
Benzoesäure	0,2 %	4,1	10	—
	0,16%	4,4	10	—
	0,12%	4,8	16,7	15
	0,08%	5,4	24	22
	0,04%	5,5	24	22
	0%	6,8	26	24
Borsäure	1,5 %; 1,2 %; 0,9 % 0,6 %; 0,3 %; 0 %	6,8	25,5	23
Hexa-methylen-tetramin	0,3 %; 0,24% 0,18%; 0,12% 0,06%; 0 %	6,8	25,5	23
Aethylester der p-Oxy benzoesäure	0,1 %; 0,08%; 0,06% 0,04%; 0,02%; 0 %	6,8	25	23
Methylester der Säure	0,2 %; 0,16%; 0,12% 0,08%; 0,04%; 0 %	6,8	24	22
p-Oxy-benzoesaures Natrium	0,233%; 0,186% 0,140%; 0,093% 0,046%; 0 %	6,8	24,4	22
Benzoesaures Natrium	0,236%; 0,188% 0,114%; 0,094% 0,047%; 0 %	6,8	24	22
Salicylsaures Natrium	0,233%; 0,186% 0,139%; 0,093% 0,046%; 0 %	6,8	24	22
Ameisensaures Natrium	0,600%; 0,480% 0,369%; 0,240% 0,160%; 0 %	6,8	24	22
Schwefligsaures Natrium	0,192%; 0,154% 0,115%; 0,077% 0,038%; 0 %	6,8	24,4	22

2. *Einwirkung der Substanzen auf den Stärkeabbau durch Pankreasamylase.*

(Vgl. Speichelamylase.)

Die zu den Verzuckerungsversuchen zugesetzten Stoffe waren dieselben wie bei Speichelamylase und wurden in den gleichen Konzentrationen angewendet. Das Ferment kam auch auf Sulkowskystärke zur Einwirkung.

Die Pankreamylase wurde aus getrockneten Pankreasdrüsen von Schweinen durch Extraktion mit Aceton gewonnen. Dieses Präparat wurde dann mit Glycerin extrahiert. Nach dem Ansäuern mit Essigsäure wurde Aluminiumhydroxyd B zugegeben. Dieses wurde durch Eintragen von Aluminiumsulfat in 20% ige Ammoniaklösung hergestellt. An das Aluminiumhydroxyd wurde die Lipase adsorbiert. Die Amylase bleibt in der Lösung. Sie wird von Trypsin durch Zugabe von Kaolin zur sauren Lösung getrennt, welches das Trypsin adsorbiert (Willstätter[39])).

Der Versuchsansatz bestand auch hier aus 50 ccm. Die Versuchsreihen mit Pufferlösungen enthielten ein Gemisch aus primären und sekundären Phosphaten. Fast bei allen Versuchen wurden pH-Messungen mit der Indikatormethode angestellt. Die Versuchstemperatur wurde im Brutschrank mittels Thermostaten auf 37,5° gehalten und die Versuchsdauer auf 30 Minuten festgesetzt. Nach dieser Zeit wurde der bei Gegenwart der Stoffe durch Pankreasamylase aus der Stärke gebildete Zucker nach der Bertrand'schen Methode bestimmt. Ausgeführt wurde die Bestimmung auch hier in 10 ccm des Reaktionsgemisches nach unterbrochener Amylolyse.

Vor den Versuchen wurde der Wirkungswert der Pankreasamylase bestimmt.

Minuten t	gebildete Maltose in mg M	k
10	48	0,0142
15	71	0,0140
30	134	0,0148
∞	374	—

$$k_m\ (10 + 15) = 0{,}0141$$

$$Sf = \frac{0{,}0141 \cdot 0{,}374}{0{,}000248} = 21{,}3$$

Pankreasamylase.

Versuche.

Versuchszeit 30 Minuten, Versuchstemperatur 37,5°.

In 10 dem Reaktionsgemisch entnommenen ccm (Lösung auf Stärke absolut bezogen 0,5%, auf Pankreasamylase 0,2%; Sf der Amylase 21,3) wurde der gebildete Zucker gemessen.

Stoff	Konzentration des zu untersuchenden Stoffes	bei dem Versuch gemessenes pH	mg Cu	mg Maltose
Methylester der p-Oxybenzoesäure	0,2 %; 0,16 % 0,12 %; 0,08 % 0,04 %; 0 %	6	24	22
Aethylester der Oxybenzoesäure	0,1 %; 0,08 % 0,06 %; 0,04 % 0,02 %; 0 %	6	23—24	21 u. 22
Borsäure	1,5 %; 1,2 % 0,9 %; 0,6 % 0,3 %; 0 %	5,9	24	22
Hexamethylentetramin	0,3 %; 0,24 % 0,18 %; 0,12 % 0,06 %; 0 %	5,9	24,0	22
p-Chlorbenzoesäure	0,006%; 0,005% 0,003%; 0,002% 0,001%; 0 %	6,0	24	22
Salicylsäure 0,2 %;	0,16 %; 0,12 % 0,08 %; 0,04 % 0 %;	2,6,2,7,2,8, 2,8,3,2. 6,0	0 25	0 23
p-Oxybenzoesäure 0,2 %; 0,08 %;	0,16 %; 0,12 % 0,04 %; 0 %;	3,4,3,4,3,4. 3,6,3,6. 6,0	0 25	0 23
Benzoesäure 0,2 %; 0,08 %;	0,16 %; 0,12 % 0,04 %; 0 %;	3,2;3,2;3,2; 3,2;3,6; 6,0	0 25	0 23
Propylester der p-Oxybenzoesäure 0,05 %; 0,02 %;	0,04 %; 0,03 % 0,01 %; 0 %	6	25	23

Stoff	Konzentration des zu untersuchenden Stoffes	bei dem Versuch gemessenes pH	mg Cu	mg Maltose
Schweflige Säure	0,125%; 0,100%; 0,075%	2,6;2,6;3,2;	0	0
	0,050%; 0,025%;	3,6;3,8;		
	0 %;	6	25	23
Ameisensäure	0,4 %; 0,32 %; 0,24 %	2,7;2,7;2,8;	0	0
	0,16 %; 0,08 %;	2,7;2,8;		
	0 %;	6,0	25	23

Versuche unter Zusatz eines Puffergemisches aus 5,1 ccm sekundärem Natriumphosphat + 4,9 ccm primärem Kaliumphosphat.

Ameisensäure	0,4 %; 0,32 %; 0,24 %	2,8;2,8;2,8;	0	0
	0,16 %; 0,08 %;	3,0;3,2		
	0 %;	6,9	25	23
Schweflige Säure	0,125%; 0,100%; 0,075%	3,8;3,8;3,8;	0	0
	0,050%; 0,025%;	4,0;5,9;	24	22
	0 %;	6,9	25	23
Salicylsäure	0,2%; 0,16 %; 0,12 %; 0,08 %	3,5;3,5;3,8;	0	0
	0,04 %; 0 %;	6,9	23	21
Benzoesäure	0,2 %; 0,16 %	4,0;4,4;	0	0
	0,12 %; 0,08 %	4,8	unter 10	unter 10
	0,04 %;	5,9	23	21
	0 %;	6,9	23,5	21
Propylester der p-Oxybenzoes.	0,05 %; 0,04 %; 0,03 %			
	0,02 %; 0,01 %; 0 %	6,9	23,3	21

Die folgenden Säuren wurden in gepufferten Lösungen als Natriumsalze untersucht:

Benzoesaures Natrium	0,236%; 0,189%; 0,142%			
	0,094%; 0,047%; 0 %	6,8	27,5	25
Salicylsaures Natrium	0,233%; 0,186%; 0,140%			
	0,093%; 0,046%; 0 %	6,8	27,5	25

Stoff	Konzentration des zu untersuchenden Stoffes	bei dem Versuch gemessenes pH	mg Cu	mg Maltose
p-Oxybenzoesaures Natrium	0,233%; 0,186%; 0,140% } 0,093%; 0,046%; 0 % }	6,8	27,7	25
Schwefligsaures Natrium	0,192%; 0,154%; 0,115% } 0,077%; 0,038%; 0 % }	6,8	27,5	25
Ameisensaures Natrium	0,600%; 0,480%; 0,360% } 0,240%; 0,160%; 0 % }	6,8	27,7	25

3. Einwirkung der Stoffe auf den Eiweißabbau durch Pepsin.

Zur Untersuchung kamen dieselben Stoffe wie bei Speichelamylase, teils in den gleichen Konzentrationen, teils in den hier bei den Versuchen selbst angegebenen, in ihrer Wirkung auf Pepsin. Von den Untersuchungen der Natriumverbindungen der Säuren sah ich wegen des im sauren Gebiet liegenden pH-Optimus des Pepsins ab.

Das Pepsinpräparat war nach den Vorschriften des Deutschen Arzneibuches hergestellt. Es wurde in 0,1% iger Lösung verwendet. Das Reaktionsvolumen war 10 ccm und enthielt 0,05 ccm 25%ige Salzsäure. Es wurde gemäß folgender Tabelle hergestellt:

Versuch	1	2	3	4
Salzsaure 0,1%ige Pepsinlösung + Substanz ccm	10	7,5	5	2,5
Salzsaure 0,1%ige Pepsinlösung ccm	0	2,5	5	7,5

Die Fermentwirkung wurde nach der Methode des DAB 6 gemessen. Im Reaktionsvolumen von 10 ccm, enthaltend 0,05 ccm Salzsäure und 0,01 g Pepsin, wurde 1 g frisches zersiebtes Eiweiß zur Verdauung gebracht. Es wurde jede Viertelstunde durch Umschwenken wieder vermischt. Das 10 Minuten zu kochende Ei hatte am besten ein Alter von 5 Tagen (Dispensatory United States). Das Weißei ist nach dem Kochen sogleich zu verwenden. Bei einer Versuchstemperatur von 45° betrug die zur vollständigen Auflösung

des 1 g Eiweiß erforderliche Zeit durchschnittlich 3,5 Stunden. Wenn aber das gekochte Weißei bei Zimmertemperatur liegen bleibt, so beträgt nach von mir angestellten Versuchen die Verdauungszeit nach einem Tag 4¾ Stunden. Im Eisschrank ebenso lange aufbewahrte gekochte Eier zeigten während der gewöhnlichen Versuchszeit überhaupt keinerlei sichtbare Eiweißauflösung.

Pepsin.

Versuche.

Stoff	Konzentration				Vollständige Auflösung des Eiweiß nach Std.:
Borsäure	1,5 %	1,2 %	0,9 %	0,6 %	
	0,3 %	0,15 %	0 %		4
p-Chlor-	0,006%	0,005%	0,003%	0,002%	
benzoesäure	0,001%	0,0006%	0 %		3
Hexamethylen-	0,3%	0,23%	0,15%	0,075%	keine sichtb.Aufl.
tetramin				0 %	4
Hexamethylen-	0,1 %	0,075%	0,05 %		keine sichtb.Aufl.
tetramin			0,025%		6
		0,01 %	0 %		4
Methylester		0,2 %	0,15 %		keine sichtb.Aufl.
der p-Oxybenzoe-			0,1 %		8
säure		0,05 %	0 %		3½
Methylester der			0,2 %		8
p- Oxybenzoesäure			0,15 %		6½
mit doppelter			0,1 %		4½
Pepsinmenge			0 %		2
Aethylester der			0,1 %		keine sichtb.Aufl.
p-Oxybenzoesäure			0,075%		6½
			0,05 %		5
		0,025%	0 %		3½
Aethylester der			0,1 %		4
p-Oxybenzoesäure mit			0,075%		3
doppelter Pepsinmenge			0 %		2
Propylester der			0,05 %		keine sichtb.Aufl.
p-Oxy-benzoesäure			0,038%		6½
		0,025%	0,013%	0%	3½

Stoff	Konzentration		Vollständige Auflösung des Eiweiß nach Std.:
Propylester der		0,05 %	keine sichtb.Aufl.
p-Oxybenzoesäure mit		0,038%	3
doppelter Pepsinmenge		0 %	2
Borsäure 0,2% 0,15% 0.1%	0,05%	0 %	3½
Ameisensäure		0,4 %	5½
		0,3 %	4½
		0,2 %	4
	0,1 %	0 %	3½
Schweflige Säure		0,125%	5½
		0,093%	4½
		0,062%	4
	0,031%	0 %	3½
Salicylsäure		0,2 %	keine sichtb.Aufl.
		0,15 %	kaum sichtb.Aufl.
		0,1 %	5½
		0,05 %	4½
		0 %	3½
Salicylsäure mit doppelter		0,2 %	—
Pepsinmenge		—0,15 %	2Tage
		0 %	2Stunden
Benzoesäure	0,2 %	0,15 %	keine sichtb.Aufl.
		0,1 %	4½
		0,05 %	4
		0 %	3½
Benzoesäure mit doppelter		0,2 %	4½
Pepsinmenge		0,15 %	4
		0 %	2
p-Oxybenzoesäure		0,2 %	3¾
	0,15 %	0,1 %	3½
	0,05 %	0 %	3⅓

Mit der gleichen Methode wie vorher wurden Borsäure, Salicylsäure und Aethylester der p-Oxybenzoesäure in den 6 angegebenen Konzentrationen mit Leerversuchen zur Verdauung angesetzt. Der Versuch wurde in dem Zeitpunkt abgebrochen, zu dem der Leerversuch völlig verdaut war, nämlich nach 3½ Stunden. Die Versuchslösungen wurden dann in Zentrifugengläser überführt und das unverdaute Eiweiß nach dem Zentrifugieren in ccm. abgelesen. Es wurden gemessen bei

a) Borsäure

in den Konzentrationen %:	1,5	1,2	0,9	0,6	0,3	0,15	0.
unverdautes Eiweiß ccm:	0	0	0	0	0	0	0.

b) Aethylester der p-Oxybenzoesäure

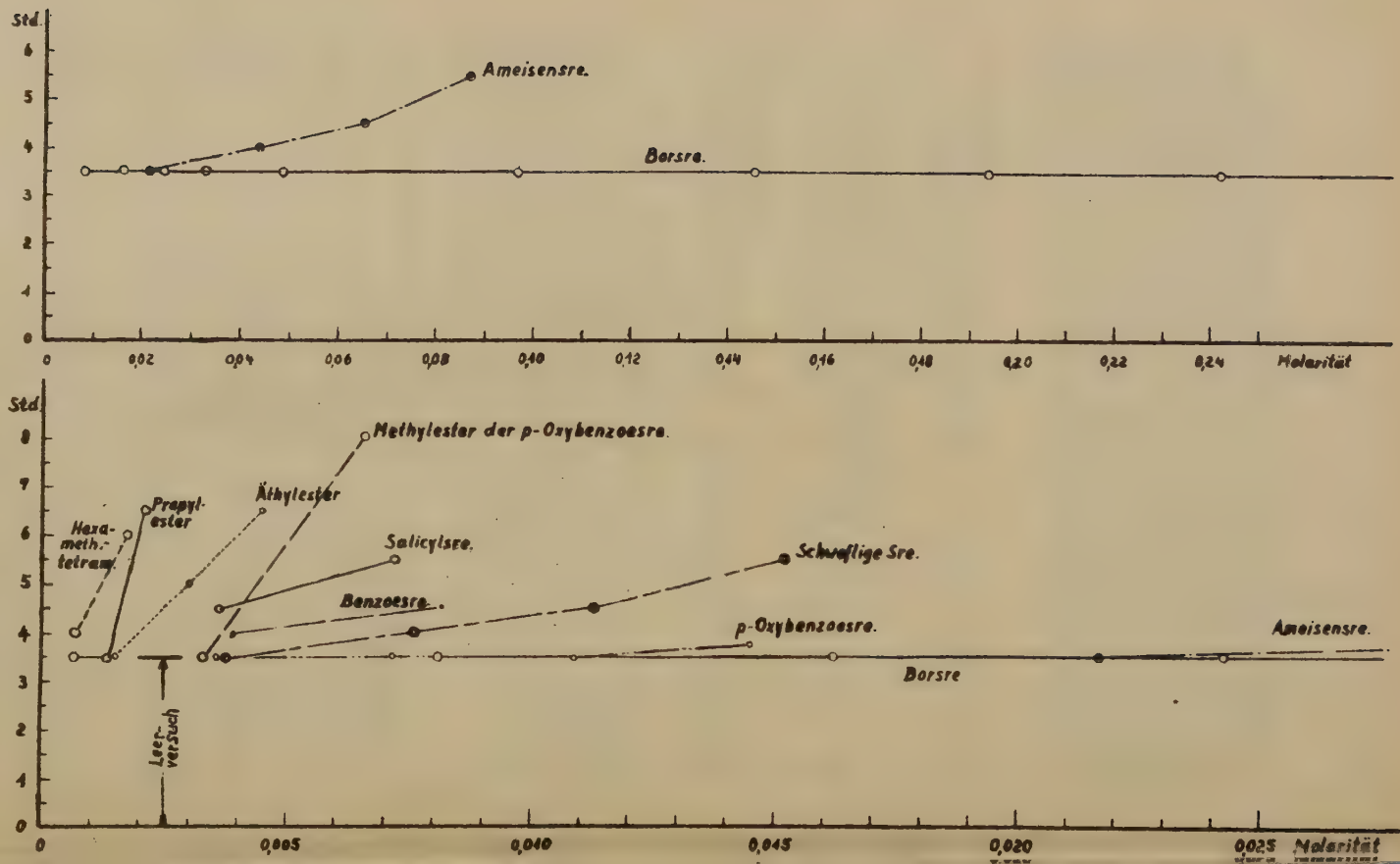
in den Konzentrationen %:	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	0,01	0.
unverdautes Eiweiß ccm:	2,8	2,6	1,4	0,4	0	0	0.

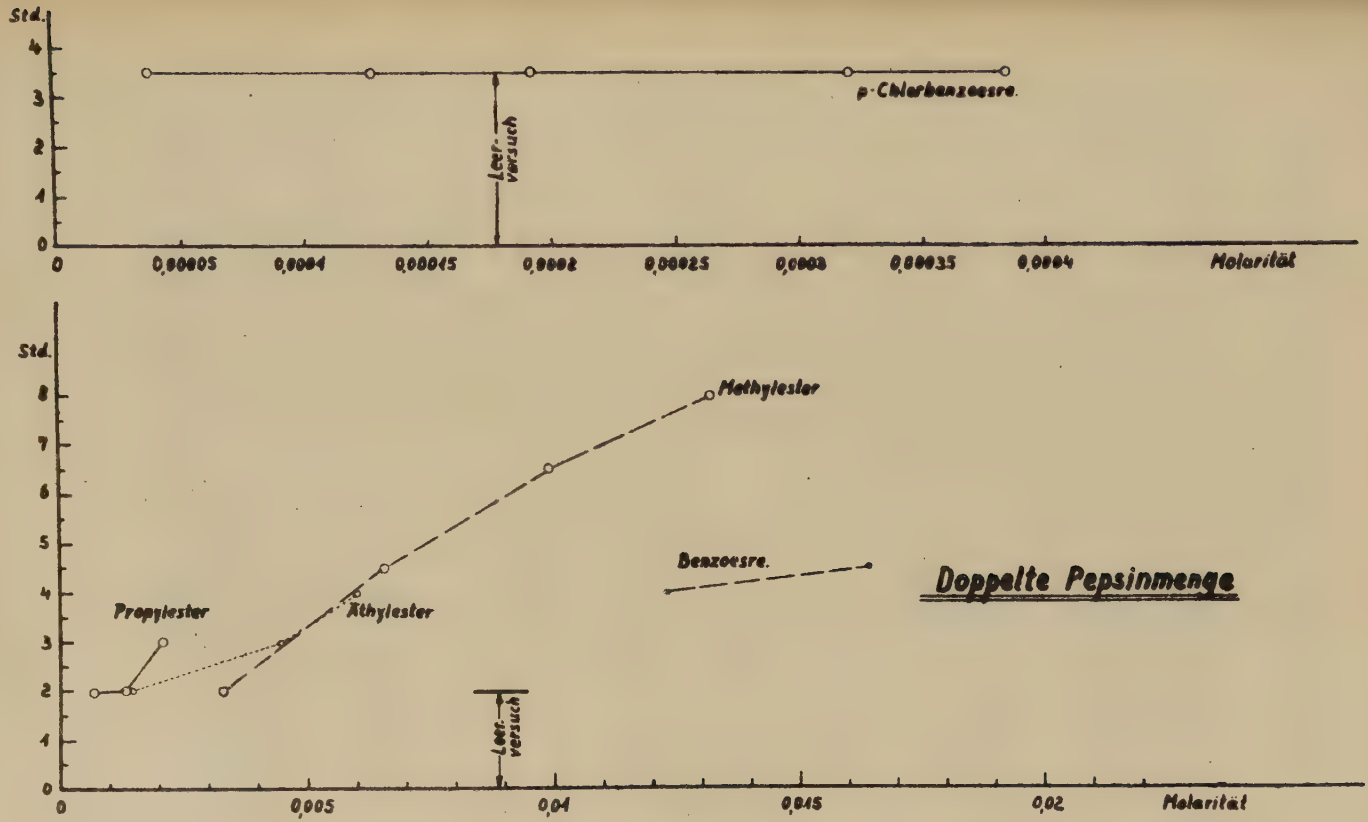
c) Salicylsäure

in den Konzentrationen %:	0,2	0,16	0,12	0,08	0,04	0,02	0.
unverdautes Eiweiß ccm:	3,05	2,95	2,8	2,0	0,6	0	0.

Um die in Wasser sehr wenig lösliche p-Chlorbenzoesäure in höherer Konzentration auf das Pepsin zur Einwirkung bringen zu können, sollte eine verdünnte Alkohollösung der Säure Anwendung finden. Es war daher vorerst der Einfluß des Alkohols auf das Pepsin zu prüfen und zwar in den Konzentrationen 1—10%. Außerdem wurde zu Vergleichszwecken Kochsalz in den Konzentrationen 1 n bis $^1/_{80}$ n zur Untersuchung herangezogen.

Stoff	Konzentrationen					Vollständige Auflösung des Eiweiss nach Std.
Alkohol				10 %	8 %	keine sichtbare Auflösung
6 %	4 %	2 %	1 %	0 %		3½
Koch- salz	6 %	1 %	0,8%	0,6%		keine sichtbare Auflösung
				0,4%		4
		0,2%	0,1%	0 %		3½


Std.
Ameisensre.
Borsre.
Molarität
Methylester der p-Oxybenzoesre.
Äthylester
Propyl-
ester
Hexa-
meth.-
tetram.
Salicylsre.
Schweflige Sre.
Benzoesre.
p-Oxybenzoesre.
Ameisensre.
Borsre
Leer-
versuch


Std.
4
3
2
4
0
p-Chlorbenzoesre.
Leer-versuch
0
0,00005
0,0001
0,00015
0,0002
0,00025
0,0003
0,00035
0,0004
Molarität
Std.
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Methylester
Benzoesre.
Doppelte Pepsinmenge
Propylester
Äthylester
Leer-versuch
0
0,005
0,01
0,015
0,02
Molarität

4. Einwirkung der Substanzen auf den Eiweißabbau durch Trypsin.

Zur Untersuchung kamen sowohl die gleichen Stoffe als auch die gleichen Konzentrationen wie bei Speichelamylase. Da sich im menschlichen Körper die Trypsinverdauung ausschließlich in alkalischem Gebiet vollzieht, habe ich hier von Untersuchungen mit den freien Säuren ganz abgesehen und nur die Natriumverbindungen untersucht.

Zu den Trypsin-Verdauungsversuchen benutze ich ein Trypsinpräparat, das aus der zweiten Extraktionslösung der Bauchspeicheldrüsen von Schweinen mit Glycerin nach dem Ansäuern durch Adsorption an Kaolin nach Willstätter[39]) gewonnen wird. Das Präparat wurde mit der Fuldschen Methode nach Fuldeinheiten eingestellt. 0,09 ccm einer 0,1%igen Lösung des Fermentpräparates entsprachen nach der einstündigen Einwirkungszeit bei 37,5° zwei Fuldeinheiten. 1 ccm der 0,1%igen Lösung hat demnach 180 Fuldeinheiten, d. h. kann 180 mg Kasein verdauen. Angewandt wurde bei den folgenden Versuchsreihen auf 20 ccm Reaktionsgemisch 1 ccm 0,5%ige Fermentlösung. Der Versuchsansatz bestand immer aus 20 ccm 4%iger Peptonlösung. Diese wurde durch Zugabe des Peptons zu Wasser hergestellt. Sie stand zwei Stunden bei Zimmertemperatur, eine Stunde auf dem Wasserbad und wurde dann nach dem Abkühlen filtriert und benutzt. Der Versuchansatz bestand aus:

20 16 12 8 4 0 ccm 4%iger Peptonlösung + Substanz + 0 4 8 12 16 20 ccm 4%iger reiner Peptonlösung.

1 g Pepton enthält 0,1 g = 10% Stickstoff. 1 ccm n/5 NaOH. 0,105 = 2,8. 0,105 = 2,94 mg N. Ich brauchte z. B. nach zwei Stunden 3,7 ccm n/5 NaOH nach Formolzusatz zur Titration der Lösung. Dies entspricht 10,9 mg Stickstoff. Der Gesamtstickstoff der 20 ccm Reaktionsgemisch ist 0,08 g. Also waren in dem Falle nach zwei Stunden 13,6% des Gesamtstickstoffs bei der Verdauung abgebaut.

Zur Bestimmung der durch Trypsin bewirkten Peptonspaltung diente die Sörensen'sche Methode, bei der eine 30 bis 40%ige eingestellte Formollösung verwendet wird. Die Versuchstemperatur wurde im Brutschrank mittels Thermostaten auf 37,5° gehalten. Die Versuchsdauer wurde zwischen ½ und 2 Stunden variiert.

Trypsin-Versuche.

Versuchszeit ½—2 Stunden. Versuchstemperatur 37,5°.
Peptonlösung 4%.

Stoff	Konzentration des zu untersuchenden Stoffes	bei dem Versuch gemess. ph	Mit Formol befr. COOH in ccm NaOH	als % des Totalstickstoff.
Methylester der p-Oxybenzoesäure Versuchsdauer 1¾ Std.	0,2 %; 0,16 %; 0,12 % 0,08 %; 0,04 %; 0 %	7	3,1	11,4
Aethylester der p-Oxybenzoesäure Versuchsdauer 1¾ Std.	0,1 %; 0,08 %; 0,06 % 0,04 %; 0,02 %; 0 %	7	3,1	11,4
Propylester der p-Oxybenzoesäure Versuchsdauer 1¾ Std.	0,05 %; 0,04 %; 0,03 % 0,02 %; 0,01 %; 0 %	7	3,1	11,4
Hexamethylentetramin Versuchsdauer 30 Min.	0,3 %; 0,24 %; 0,18 % 0,12 %; 0,06 %; 0 %	7	1,1	4,04
p-Chlorbenzoesäure Versuchsdauer 1 Std.	0,006%; 0,005% 0,004%; 0,002%; 0,001% 0 %	7,5	1,40	5,10
Borsäure Versuchsdauer 1 Std.	1,5 %; 1,2 %; 0,9 % 0,6 %; 0,3 %; 0 %	7,5	1,4	5,10
Natriumsalicylat Versuchsdauer 2 Std.	0,233%; 0,186% 0,140%; 0,093% 0,047%; 0 %	7	3,90	14,40
Benzoesaures Natrium Versuchsdauer 2 Std.	0,236%; 0,189% 0,142%; 0,094% 0,047%; 0 %	7	3,65	13,4

Stoff	Konzentration des zu untersuchenden Stoffes	bei dem Versuch gemess. ph	Mit Formel betr. COOH in ccm NaOH	als % des Totalstickstoff
p-Oxybenzoesaures Natrium Versuchsdauer 2 Std.	0,233%; 0,186%; 0,14 % 0,093%; 0,047% 0 %	7	3,90	14,40
Schwefligsaures Natrium Versuchsdauer 2 Std.	0,192%; 0,153%; 0,115% 0,077%; 0,038% 0 %	7	3,65	13,4
Ameisensaures Natrium Versuchsdauer 2 Std.	0,600%; 0,480% 0,360%; 0,240% 0,120%; 0 %	7	3,65	13,4

B.

Umwandlung der p-Oxybenzoesäure im menschlichen Körper.

Die p-Oxybenzoesäure wurde mehrmals täglich in Pulverform per os eingenommen und mit Wasser heruntergespült.

Von der ersten Einnahme ab bis zwei Tage nach der letzten Einnahme wurde der Harn gesammelt. Er wurde zur Untersuchung verarbeitet.

A) Bestimmung der Schwefelsäure (ungepaart und gepaart) nach Baumann-Herter[36]).

Die Bestimmung wurde von mir in 50 ccm des gesamten Tagesharns ausgeführt. Sie beruht auf nacheinander folgenden Ausfällen der beiden Schwefelsäuren mit Bariumchlorid und quantitativer Messung.

A = Sulfatwert, berechnet aus dem Bariumsulfat I.
B = Sulfatwert, berechnet aus dem Bariumsulfat II.

Vor der Einnahme:

1. Bestimmung	A 0,0915 g	$\frac{A}{B} = 9{,}73$
	B 0,0094 g	
2. Bestimmung	A 0,094 g	$\frac{A}{B} = 11{,}3$
	B 0,0083 g	

Während der Einnahme:

1. Bestimmung	A 0,0971 g	$\frac{A}{B} = 6{,}14$
	B 0,0158 g	
2. Bestimmung	A 0,0954 g	$\frac{A}{B} = 7{,}54$
	B 0,0126 g	

Nach der Einnahme:

A 0,1372 g	$\frac{A}{B} = 7{,}76$
B 0,0177 g	

Die Resultate lassen sich nur so auswerten, daß nach Zufuhr von p-Oxybenzoesäure per os ein merklich stärkeres Auftreten gepaarter Schwefelsäuren im Harn beim Menschen nicht besteht.

Die nachfolgenden Versuche wurden mit einem speziell dafür angefertigten Extraktionsapparat ausgeführt. Der Apparat besteht aus einem hohen Glaszylinder, in dem sich ein Einsatz mit siebartig durchlöcherten Glasglocken befindet und an dessen oberem Ende ein großer Kugelkühler eingeschliffen ist. Ein am Apparat seitlich eingeschliffener Rundkolben für den Aether wird mittels elektrisch beheizten Wasserbades erwärmt. Der Apparat funktioniert so, daß der Aether, nachdem er durch die Glasglocken aufgestiegen ist, von selbst in den Aetherrundkolben zurückfließt.

Da der Verteilungskoeffizient Wasser/Aether bei p-Oxybenzoesäure ungünstig für das Ausäthern der Säure aus dem Harn ist, wurde vorerst die Möglichkeit der Isolierung der Säure mit Hilfe des Apparates geprüft. Es wurden 3 g p-Oxybenzoesäure in 1,5 l Harn gelöst, angesäuert, der Harn in den Apparat gegeben und 8 Stunden kontinuierlich mit Aether extrahiert. Das ätherische Extrakt wurde über Natriumsulfat getrocknet und durch Umkristallisieren gereinigt. Nachdem durch mehrfache Versuche festgestellt war, daß dabei die Säure wiedergewonnen werden konnte, konnte das gleiche Verfahren zur Bestimmung der im Harn beim Menschen nach p-Oxybenzoesäureeingabe per os auftretenden Stoffwechselprodukte benutzt werden. Es wurde nach der Eingabe der Säure der gesamte Harn gesammelt und untersucht. Je 1,5 l frischen Harns wurden nach dem Ansäuern 8 Stunden kontinuierlich mit Aether extrahiert. Das ätherische Extraktionsgut sämtlicher Extrakionen während der Einnnahmeperiode wurde mehrere Stunden über Natrium-

sulfat getrocknet und hierauf der Aether verdunstet. Der Rückstand wurde im Exsiccator getrocknet und dann im Soxhlet mehrere Stunden mit absolutem Aether ausgezogen. Dabei ging die p-Oxybenzoesäure in den Aether über und konnte nach dem Verdunsten des Aethers und mehrfachem Umkristallisieren aus Wasser rein erhalten werden. Der im Soxhlet verbleibende Rückstand wurde nun mit warmem Essigester behandelt, wobei die fast vollständig zurückgebliebene Hippursäure in Lösung ging, die ebenfalls durch Umkristallisieren aus Wasser gereinigt wurde. Der Rückstand bestand zum größten Teil aus p-Oxybenzursäure, die sich in Essigester nicht löst. Identifiziert wurden die Stoffe in der bei der quantitiven Gestaltung der Versuche angegebenen Weise durch Titration, Schmelzpunktbestimmung und Verbrennung.

Nachdem so der Weg der Trennung der einzelnen Stoffe voneinander ermöglicht war, führte ich die Untersuchung quantitativ durch. Es wurden 5 Tage lang je 3 g p-Oxybenzoesäure, also im ganzen 15 g eingenommen; vom Beginn der Einnahme bis 2 Tage nach der letzten Einnahme wurde der Harn gesammelt und je 1,5 l mit Aether extrahiert. Die Extraktion wurde in gleicher Weise, wie vorher bei den qualitativen Versuchen beschrieben, ausgeführt.

Es wurde, wie oben, der trockene Rückstand im Soxhlet mit „absolutem" Aether extrahiert, jetzt aber die Aetherlösung zur Reinigung der p-Oxybenzoesäure mit Soda behandelt, wobei die p-Oxybenzoesäure in die Sodalösung überging. Die Sodalösung wurde nach dem Ansäuern solange ausgeäthert, bis der Aether beim Verdunsten keinen Rückstand mehr hinterließ. Nach dem Trocknen und folgendem Abdunsten des Aethers wurde die Säure aus Wasser mehrmals umkristallisiert. Die so erhaltene p-Oxybenzoesäure war 4,20 g = 28% der eingenommenen Menge.

Schmelzpunkt 211°. Titration 0,136 g brauchten 19,55 ccm n/10 Lauge (Poiriers Blau), berechnet 19,7 ccm. Verbrennung: 0,1230 g Sbst. gaben 0,2733 g CO_2 und 0,0509 g H_2O.

Gef.: C 60,6%; H 4,6 %.

Ber.: C 60,9%; H 4,35%.

Der im Soxhlet verbliebene Rückstand wurde nun mit warmem Essigester behandelt und der nach Verdampfen des Lösungsmittels erhaltene Rückstand mit alkoholhaltigem

Aether aufgenommen. Die Aetherlösung wurde mit Sodalösung mehrmals ausgeschüttelt. Die nach dem Ansäuern der Sodalösung durch Ausäthern gewonnene Hippursäure wurde ebenfalls aus Wasser mehrmals umkristallisiert. Die erhaltene Hippursäuremenge betrug 1,7 g.

Schmelzpunkt 187,5°. Titration: 0,1511 g brauchten 8,50 ccm n/10 Lauge (Phenolphtalein), berechnet 8,43 ccm. Verbrennung: 0,1344 g Sbst. gaben 0,2964 g CO_2 und 0,0630 g H_2O.

Gef.: C 60,1 %; H 5,21%.
Ber.: C 60,30%; H 5,03%.

Der Rückstand, der in Essigester nicht in Lösung gegangen war, wurde in alkoholhaltigem Aether gelöst und mit Soda ausgeschüttelt. Nach dem Ansäuern wurde er wieder in dem Aether aufgenommen und nach dem Trocknen und folgendem Abdestillieren des Aethers in Wasser gelöst und darin mehrmals umkristallisiert. Die so erhaltene p-Oxybenzursäure betrug 1,42 g = 7,20% = 1,08 g p-Oxybenzoesäure. Schmelzpunkt 238° unter verfärbender Zersetzung. Titration 0,1562 g brauchten 16,15 ccm n/10 Lauge (Poiriers Blau), berechnet 16,02 ccm. Verbrennung: 0,1412 g Sbst. gaben 0,2858 g CO_2 und 0,0613 g H_2O. Mischschmelzpunkt mit synthetischer Säure 236,5°.

Gef.: C 55,2 %; H 4,84%.
Ber.: C 55,38%; H 4,63%.

Um die als p-Oxybenzursäure angesehene, aus dem Harn isolierte Verbindung sicher als solche zu charakterisieren, wurden zwei Wege eingeschlagen. Einmal führte ich die aus dem Harn erhaltene Säure durch Methylierung in die entsprechende Anisursäure über, die synthetisch aus Anisoylchlorid und Glykokoll zugänglich ist, sodaß ein Vergleich der auf beide Weisen erhaltenen Substanzen möglich war. Andererseits stellte ich direkt p-Oxybenzursäure auf dem Wege über die Carbomethoxyoxybenzoesäure her und verglich die so synthetisch erhaltene Verbindung mit der aus dem Harn gewonnenen.

Aus der auf synthetischen Wege erhaltenen Anisursäure war durch Abspaltung der Methylgruppe nach Zeisel die p-Oxybenzursäure nicht erhältlich; auch wenn ich bei sehr milden Temperaturbedingungen arbeitete, resultierte als Endprodukt in der Hauptsache p-Oxybenzoesäure.

Anisoylchlorid.

Zur Darstellung des Säurechlorids der Anissäure wurden 1½ Mol Thionylchlorid zu 1 Mol Anissäure gegeben und 1½ Stunden auf dem Wasserbad erhitzt. Das Ende der Reaktion machte sich durch Aufhören des Siedens im Reaktionsgemisch erkenntlich. Das überschüssige unzersetzte Thionylchlorid wurde im Oelbad bei 110° abdestilliert. Das Reaktionsprodukt wurde der Vakuumdestillation unterworfen. Der Vorlauf bestand ausschließlich aus Thionylchlorid. Das Anisoylchlorid selbst geht bei 13 mm Hg bei 145° über. Es erstarrt im Eis. Der Schmelzpunkt liegt bei 22°.

Anisursäure.

$CH_3OC_6H_4CONHCH_2COOH$

Zur Darstellung der Anisursäure wurde, unter dauerndem Schütteln und Erwärmen auf 60°, 1 Mol des Anisoylchlorids zu 1 Mol Glykokoll, welches in 2 Mol 2 n-Natronlauge gelöst war, portionsweise zugegeben. Nachdem das Anisoylchlorid vollständig umgesetzt war, wurde mit Salzsäure angesäuert und die ausfallende Anisursäure scharf abgesaugt. Sie wurde durch Extraktion mit absolutem Aether von kleinen Mengen vorhandener Anissäure getrennt. Schmelzpunkt 171°, Titration: 0,1220 g Säure brauchen 5,8 ccm n/10 Lauge, berechnet 5,8 ccm.

Die Ergebnisse der Synthese entsprechen den Angaben von Cahours[40]), der die Synthese auf andere Art und Weise durchführte.

Anisursäure aus p-Oxybenzursäure (des Stoffwechsels).

Die p-Oxybenzursäure wurde in alkoholischer Lösung unter Kühlung mit Diazomethanlösung im Ueberschuß versetzt und das Reaktionsprodukt nach dem Verdunsten des Alkohols aus Wasser umkristallisiert. Schmelzpunkt 170,5°. Mischschmelzpunkt mit synthetischer Anisursäure 170,5.

p-Carbomethoxyoxybenzoylchlorid.

$CH_3OOCOC_6H_4COCl$

Eine gut gekühlte Lösung von p-Oxybenzoesäure in 2 Mol n-NaOH wurde unter Umschütteln nach und nach mit 1,1 Mol chlorkohlensaurem Methyl versetzt. Darauf wurde mit verdünnter Salzsäure angesäuert. Die Fällung wurde nach dem Trocknen in Aceton gelöst und durch Zusatz von heißem Wasser zur Kristallisation gebracht. F = 179°.

20 g dieser Carbomethoxyoxybenzoesäure wurden mit 1½ Mol Thionylchlorid zur Reaktion gebracht und das Reaktionsgemisch nach dem Abdestillieren des Thionylchlorids im Vakuum destilliert. Der Siedepunkt des Säurechlorids lag bei 14 mm Hg bei 162°. Fischer[41]) stellte das Säurechlorid auf anderem Wege dar.

p-Carbomethoxyoxybenzol-glycinaethylester.

$CH_3OOCOC_6H_4CONHCH_2COO.\ C_2H_5.$

Eine gut gekühlte Lösung von 2¼ Mol des Glykokollesters, dargestellt aus Glykokollester-hydrochlorid, wurde in ätherischer Lösung mit 1 Mol in Aether gelösten Säurechlorids nach und nach versetzt. Aus dem Aether scheidet sich besonders beim Abkühlen der Ester ab.

p-Oxyhippursäure.

$OHC_6H_4CONHCH_2COOH.$

Der p-Carbomethoxyoxybenzolglykokolläthylester wurde in n-NaOH gelöst, wobei eine starke Rotfärbung auftrat, die nach einiger Zeit verschwand. Nach einer halben Stunde wurde mit der entsprechenden Menge 5 n-HCl neutralisiert. Durch Reiben wird dabei die p-Oxybenzursäure in weißen Kristallen abgeschieden. Schmelzpunkt 238°. (Fischer)[41]).

Es wurden in Tagesdosen von je 2 g, entsprechend 1,53 g p-Oxybenzoesäure, 10 g Propylester der p-Oxybenzoesäure per os innerhalb von 5 Tagen verabfolgt.

Vor der Ausführung der eigentlichen Untersuchung wurde das Verhältnis der ungepaarten und gepaarten Schwefelsäuren nach Baumann[36]) bestimmt. Die Resultate sind folgende:

Vor der Einnahme:

	A	0,0920	$\frac{A}{B} = 9{,}89$
	B	0,0093	

während der Einnahme:

1.	A	0,0958	$\frac{A}{B} = 4{,}87$
	B	0,0197	
2.	A	0,1762	$\frac{A}{B} = 6{,}83$
	B	0,0258	
3.	A	0,1162	$\frac{A}{B} = 3{,}66.$
	B	0,0318	

nach der Einnahme:

	A	0,1130	$\frac{A}{B} = 11{,}3.$
	B	0,0100	

Augenscheinlich liegt hier im Gegensatz zu den Ergebnissen bei p-Oxybenzoesäure eine verstärkte Abscheidung von gepaarten Schwefelsäuren vor.

Die Untersuchungen auf die Zusammensetzung der Stoffwechselendprodukte des p-Oxybenzoesäure-Propylesters wurden in derselben Weise wie bei p-Oxybenzoesäure ausgeführt. Der Gang der Untersuchung nach der Extraktion in saurer Lösung mit Aether ist dort ausführlich beschrieben. Bei den Versuchen mit dem Propylester wurde nun vor der Extraktion in saurer Lösung eine sechsstündige Extraktion mit Aether mit dem mit Natriumkarbonat versetzten Harn vorgenommen. Da dabei kein Propylester zurückgewonnen werden konnte, muß man annehmen, daß der Ester einer Verseifung unterliegt.

Es konnten aus dem Extraktionsgut in saurer Lösung auf dieselbe Weise, wie oben beschrieben, gewonnen werden: p-Oxybenzoesäure 1,05 g = 13,7% auf p-Oxybenzoesäure des Esters bezogen. Schmelzpunkt 210,5°. Titration: 0,1342 g der Säure brauchten 19,2 ccm n/10 Lauge (Poiriers Blau), berechnet 19,4 ccm. Verbrennung: 0,1284 g Sbst. ergaben 0,2865 g CO_2 und 0,0478 g Wasser.

Gef.: C 60,85%; H 4,24%.

Ber.: C 60,9 %; H 4,35%.

Außerdem wurde gewonnen: 1,3 g Hippursäure. Schmelzpunkt 187°. Titration: 0,1631 g brauchten 9,25 ccm n/10 Lauge

(Phenolphtalein), berechnet 9,15 ccm. Verbrennung: 0,00394 g Sbst. gaben 0,00870 g CO_2 und 0,001775 g H_2O.

Gef.: C 60,2%; H 5,04%.

Ber.: C 60,3%; H 5,03%.

Ferner konnten 0,4 g p-Oxybenzursäure = 3,7% p-Oxybenzoesäure zurückerhalten werden. Schmelzpunkt 236—238°. Titration: 0,1233 g brauchten 12,45 ccm n/10 Lauge (Poiriers Blau), berechnet 12,64 ccm. Mischschmelzpunkt mit synthetischer Säure 237°. Verbrennung: 0,1259 g Sbst. ergaben 0,2537 CO_2 und 0,0537 g H_2O.

Gef.: C 54,96%; H 4,77%.

Ber.: C 55,15%; H 4,87%.

Der so behandelte Harn wurde auf die Hälfte eingedampft und heiß mit konzentrierter Salzsäure versetzt, darauf noch einige Zeit erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde er in den oben beschriebenen Extraktionsapparat gebracht und dort während 8 Stunden mit Aether extrahiert. Das Extraktionsgut wurde nach dem Trocknen im Soxhlet mit absolutem Aether extrahiert, und aus der Aetherlösung konnte noch p-Oxybenzoesäure gewonnen werden. p-Oxybenzoesäure: 0,48 g = 6,28% der p-Oxybenzoesäure des Esters. Schmelzpunkt 211°. Titration: 0,1820 g brauchten 26,25 ccm n/10 NaOH, berechnet 26,4 ccm.

Es wurden in Tagesdosen von je 2 g entsprechend 1,29 g p-Oxybenzoesäure, 10 g des Benzylesters der p-Oxybenzoesäure per os innerhalb von 5 Tagen verabfolgt.

Vor der Ausführung der eigentlichen Versuche wurde der Benzylester in der gleichen Menge, nämlich 2 g pro Tag, an zwei Meerschweinchen mehrere Tage verfüttert. (Gewicht der Tiere um 700 g.) Es konnten keine Folgen beobachtet werden. Darauf nahm ich den Ester selbst.

Außerdem wurde vor der Ausführung der eigentlichen Versuche auch bei dem Benzylester das Verhältnis der ungepaarten und gepaarten Schwefelsäuren bestimmt(nach Baumann[36])). Die Ergebnisse sind folgende:

Vor der Einnahme:

	in g	
A	0,1172	$\frac{A}{B} = 11{,}49$
B	0,0102	

während der Einnahme:

1.	A	0,1326	$\frac{A}{B} = 2{,}63$
	B	0,0505	
2.	A	0,0920	$\frac{A}{B} = 7{,}42$
	B	0,0124	
3.	A	0,1030	$\frac{A}{B} = 3{,}56$
	B	0,0289	

nach der Einnahme:

A	0,1303	$\frac{A}{B} = 13{,}68.$
B	0,0095	

Auch hier liegt, wie beim Propylester, augenscheinlich eine verstärkte Bildung von gepaarten Schwefelsäuren vor.

Die Untersuchungen nach der Umwandlung des Benzylesters der p-Oxybenzoesäure im menschlichen Organismus wurden in der gleichen Weise wie bei p-Oxybenzoesäure angegeben, ausgeführt. Der Gang der Untersuchung nach der achtstündigen Extraktion des sauren Harns ist dort ausführlich beschrieben. Wie beim Propylester der p-Oxybenzoesäure wurde hier vor der Exraktion in saurer Lösung eine sechsstündige Extraktion des mit Natriumbicarbonat versetzten Harns mit Aether vorgenommen. Dabei konnte ich 0,60 g des Esters = 6% erhalten. Schmelzpunkt 114°. Titration: 0,100 g brauchten 4,55 ccm n/10 Lauge, berechnet 4,67 ccm.

Es konnten aus dem Extraktionsgut in saurer Lösung auf dieselbe Weise wie oben beschrieben, gewonnen werden: p-Oxybenzoesäure: = 0,82 g = 12,7% der p-Oxybenzoesäure des Esters. Schmelzpunkt 211°. Titration: 0,1506 g brauchten 22 ccm n/10 Lauge, berechnet 21,8 ccm. Verbrennung: 0,1256 g Sbst. gaben 0,2801 g CO_2 und 0,0493 H_2O.

Gef.: C 60,8%; H 4,39%.

Ber.: C 60,9%; H 4,35%.

Ferner erhielt ich 2,1 g Hippursäure. Schmelzpunkt 186,0°. Titration: 0,1840 g brauchten 10,35 ccm n/10 Lauge, berechnet 10,3 ccm. Verbrennung: 4,33 mg Sbst. gaben 0,00945 g CO_2 und 0,001895 g H_2O.

Gef.: C 60,16%; H 4,89%.

Ber.: C 60,3 %; H 5,03%.

Daß hier größere Mengen Hippursäure als bei der Zufuhr des Propylesters erhalten wurden, ist wohl auf den bei Verseifung des Esters entstehenden Benzylalkohol (Quick[29]) zurückzuführen. Es ist dabei zu berücksichtigen, daß bei dieser Aufarbeitungsmethode des Harns die Hippursäure an sich nicht restlos erhalten wird. Dies beeinträchtigt aber die hier über die Veränderung der p-Oxybenzoesäure und ihre Ester ausgeführten Untersuchungen nicht, da ja die Umsetzung der Säure und ihrer Ester nicht zur Hippursäure führen dürfte.

Außerdem konnten 0,32 g p-Oxybenzursäure = 3,5% p-Oxybenzoesäure zurückerhalten werden. Schmelzpunkt 238,0°. Titration: 0,1354 g brauchten 13,9 ccm n/10 Lauge (Poiriers Blau), berechnet 13,8 ccm. Mischschmelzpunkt mit synthetischer Säure 237,0°. Verbrennung: 0,1314 g Sbst. gaben 0,2653 g CO_2 und 0,0564 g H_2O.

Gef.: C 55,06%; H 4,80%.

Ber.: C 55,15%; H 4,87%.

Der Harn wurde nach der Extraktion auf das halbe Volumen eingedampft und darauf heiß mit konzentrierter Salzsäure versetzt. Er wurde dann noch einige Zeit erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde der so behandelte Harn in den Extraktionsapparat gebracht und dort 8 Stunden lang mit Aether extrahiert. Nach dem Trocknen wurde der Rückstand der Aetherlösung im Soxhlet mehrere Stunden mit absolutem Aether extrahiert. Aus der Aetherlösung konnte noch eine kleine Menge p-Oxybenzoesäure gewonnen werden.

p-Oxybenzoesäure: 0,45 g = 7,0% der als Benzylester eingenommenen Menge p-Oxybenzoesäure = 4% des Esters. Schmelzpunkt 211,8°. Titration: 0,165 g brauchten 23,65 ccm n/10 Lauge, berechnet 23,8 ccm.

An dieser Stelle möchte ich Gelegenheit nehmen, meinen hochverehrten Lehrern, Herrn Professor Dr. Mannich und Herrn Professor Dr. Sabalitschka für ihr förderndes Wohlwollen meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Literatur-Verzeichnis.

1) Entwurf zur Verordnung für Lebensmittel, Heft 15, 1932.
2) Hata, Bioch. Ztschrft. *17*, 156.
3) Persson, Dtsche. Ztschr. f. Homöopathie Nr. 10, 1930.
4) Smorodinzew, Bioch. Ztschr. *141*, 297.
5) Sherman, Ill. American. Soc. *43*, 2454.
6) Chittenden, Malys Jahrbuch *15*, 277 und *20*, 248.
7) Olsson, H. *117*, 91, *119*, 1, *126*, 29.
8) Myrbäck, H. *159*, 48 und 70.
9) Ernström, H. *119*, 204.
10) Pinkussohn, Bioch. Ztschr. *40*, 307.
11) Vandevelde u. Poppe, Bioch. Ztschr. *28*, 134, *8*, 387.
12) Langley, Il. of Phys. *3*, 246.
13) Levites, Ztschr. f. phys. Chemie *48*, 187.
14) Krüger, Bioch. Zentr. Bl. *1*, 484.
15) Pawlowsky, Bioch. Zentr. Bl. *1*, 484.
16) Haneborg, Acta med. Skand. Suppl. *1*, 1.
17) Alfonski, Bioch. Zentr. Bl. *6*, 940.
18) König, Chemiker-Ztg. *55*, 5. 12. 31.
19) Heiduschka u. Förster, Arch. f. Pharm. 1932, 419.
20) Schütz, Prager med. Wochenschr. *20*, 193.
21) Heineberg u. Bachmann, Il. Amer. Ass. *53*, 1454.
22) Sailer u. Farr, Amer. Il. Med. Sc. *133*, 113.
23) Gudeman, Jou. Amer. Chem. Soc. *27*, 1436.
24) Loew, Malys Jahrbuch *18*, 272.
25) Weiss, Ztschr. f. phys. Chemie *40*, 480.
26) Kaufmann, Ztschr. f. phys. Chem. *39*, 434.
27) Neuberg, Bioch. Ztschr. *145*, 249.
28) Rost, Arb. aus dem Kais. Gesundh.-Amt *45*, 425.
29) Quick, Journal biol. Chem. *95*, 189, *96*, 83, *97*, 69.
30) Diack u. Lewis, Journ. biol. Chem. *77*, 89.
31) Power u. Sherwin, Arch. of internat. Med. *39*, 60.
32) Wührer, Arch. f. exp. Path. *161*, 719.

33) Holmes, Journ. Pharm. exp. Therapeutics *26*, 297.
34) Girod, Journ. pharmac. Chem. *89*, 513.
35) Schübel u. Manger, Arch. f. exp. Path. *146*, 209.
36) Baumann u. Herter, Ztschr. f. phys. Chem. *1*, 70 u. 244, *7*, 23.
37) Pringsheim u. Gorodiski, Bioch. Ztschr. *140*, 175.
38) Euler u. Svanberg, H. 112, S. 193.
39) Willstätter, Ztschr. f. phys. Chem. *125*, 132, *126*, 143, *142*, 14; Ber. *56*, 150.
40) Cahours, A. *109*, 32 u. A. Ch. *23*, 351.
41) Fischer, Ber. *41*, 2880.

Lebenslauf.

Ich, Ruth Neufeld, wurde als Tochter des Arztes Dr. Ludwig Neufeld, am 2. August 1908 in Posen geboren. Ich besuchte die staatliche Luisenschule in Posen und die Augustaschule Berlin. Nachdem ich 1929 die Reifeprüfung bestanden hatte, studierte ich in Heidelberg und Berlin Chemie. Ich begann nach dem 2. Verbandsexamen meine Doktorarbeit, die ich im Wintersemester 1932/33 beendigte.